

INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.

Photographs included in the original manuscript have been reproduced xerographically in this copy. Higher quality 6" x 9" black and white photographic prints are available for any photographs or illustrations appearing in this copy for an additional charge. Contact UMI directly to order.

**ProQuest Information and Learning
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA
800-521-0600**

UMI[®]

**PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DE LA β -1,6 GLUCANASE PRODUITE PAR
STREPTOMYCES SP.EF-14**

Par

Caroline Leclerc

**mémoire présenté au département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maîtrise ès sciences (M.Sc.)**

**FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE**

Sherbrooke, Québec, Canada, avril 2000

III - 1288



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

**395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-67302-2

Canada

Le 27 avril 2000 , le jury suivant a accepté ce mémoire dans sa version finale.
date

Président-rapporteur: Mme Carole Beaulieu
Département de biologie

Membre: M. Claude Déry
Département de biologie

Membre: M. Ryzard Brzezinski
Département de biologie

SOMMAIRE

Le pourridié des racines du framboisier est une maladie causée par un champignon phytopathogène du genre *Phytophthora*. La prolifération de celui-ci peut-être diminuée par l'utilisation de produits chimiques l'Érridomil et l'Aliette. Malheureusement, depuis les années 1990 des souches de *Phytophthora fragariae* var *fragariae* résistantes à ce moyen de lutte ont été observées. L'élaboration d'un moyen de lutte biologique active contre *Phytophthora* devenait une alternative intéressante, soucieuse de l'environnement. Dans notre laboratoire, des actinomycètes, bactéries du sol à Gram positifs, ont été sélectionnés pour leur capacité à protéger les plants de framboisiers (*Rubus strigosus*) contre les infections causées par les *Phytophthora*.

La paroi de ce phytopathogène est en grande partie constituée de glucanes, polymères composés de molécules de glucoses formées par des liens glycosidiques de type β . Les actinomycètes capables d'inhiber la croissance de *Phytophthora*, produisent des enzymes extracellulaires capables de lyser la paroi cellulaire de ce champignon. Ces enzymes sont les β -glucanases.

Comme les β -glucanases sembleraient jouer un rôle important au sein du phénomène d'antagonisme, nous avons donc entrepris l'étude des glucanases produite chez une souche antagoniste au *Phytophthora*, *Streptomyces* sp. EF-14. Cette souche à été choisie parmi

d'autres pour son excellente production de β -glucanases. Le but à long terme serait d'élaborer un programme de lutte biologique efficace contre l'agent causal du pourridié des racines du framboisier.

C'est la β -1,6 glucanase qui nous intéresse plus particulièrement dans le présent projet. Elle aurait une participation importante dans la destruction de la paroi cellulaire du *Phytophthora*. Dans ce projet, les conditions de culture et de production de la β -1,6 glucanase par la souche *Streptomyces* EF-14 en fermenteur ont été maximisées. De plus, nous avons élaboré un protocole de purification efficace de la β -1,6 glucanase produite par EF-14. Par la suite, des séquences internes en acides aminés de la protéine purifiée ont été obtenues.

REMERCIEMENTS

Tel qu'à une soirée de remise des Oscars, je tiens à remercier tout spécialement mon directeur de recherche, Ryszard Brzezinski pour son soutien, ses précieux conseils et sa disponibilité. Je voudrais aussi remercier le groupe de recherche sur les actinomycètes, c'est-à-dire mes confrères et consœurs de travail. De plus, je tiens à souligner l'aide apportée par mes conseillers, Carole Beaulieu et Claude Déry.

Merci à Hapsatou, Joanne, Nathalie et Sonya pour les séances d'encouragement et de défoulement!

Je ne peux passer sous silence le soutien moral apporté, la patience, les retours tardifs au laboratoire lors d'oublis, beau temps mauvais temps il était là. Je vous pris d'applaudir mon compagnon de vie, Olivier. Merci! Je remercie aussi mes parents qui ont crû en moi et pour leur encouragement tout au long de ces dernières années universitaires.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES	x
INTRODUCTION	1
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	11
1.1 Souches de microorganismes	11
1.2 Milieux de culture	11
1.3 Production de la β -1,6 glucanase.....	12
1.3.1 Production de la β -1,6 glucanase en fermenteur	12
1.4 Dosage de l'activité β -1,6 glucanase.....	13
1.4.1 Préparation du substrat	14
1.4.2 Détermination des sucres réducteurs à l'aide du réactif PAHBAH.....	13
1.4.3 Définition de l'unité d'activité enzymatique.....	15
1.4.4 Dosage des protéines totales.....	15

1.5 Purification de la β -1,6 glucanase chez EF-14	16
1.5.1 Précipitation à l'éthanol.....	16
1.6 Purification par chromatographie.....	17
1.7 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE)	19
1.8 Digestions de pustulane.....	20
1.8.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)	21
1.9 Analyse des produits de digestion par HPLC.....	22
1.10 Séquences internes de la β -1,6 glucanase	22
RÉSULTATS.....	23
2.1. Production de la β -1,6 glucanase par la souche EF-14.....	23
2.2 Production de la β -1,6 glucanase par la souche EF-14, en fermenteur	23
2.4 Mécanisme d'action de la β -1,6 glucanase purifiée chez <i>Streptomyces</i> sp. EF-14	34
2.5 Analyse des produits de digestion du pustulane par HPLC	39
2.6 Analyse des séquences internes de la protéine purifiée	40
DISCUSSION	43
CONCLUSION.....	58
BIBLIOGRAPHIE.....	60

LISTE DES ABRÉVIATION

YME : Yeast Malt Extract

CHUL : Centre Hospitalier de l'Université Laval

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

PCR : Polymérisation en Cascade

PAHBAH : acide p-hydroxybenzoïque hydrazide

Nm : nanomètre

µg : microgramme

µg : microgramme

µl : microlitre

µmole : micromole

°C : degré Celcius

a.a : acide aminé

cm : centimètre

g : gramme

kDa : kiloDalton

M : mole

mg : milligramme

min : minute

ml : millilitre

mM : millimolaire

mU : milliunité

ng : nanogramme

rpm : rotation par minute

U : unité

LISTE DES TABLEAUX

1. Purification de la β -1,6 glucanase de <i>Streptomyces</i> sp. EF-14.....	28
2. Quantité de sucres réducteurs relâchés par rapport au temps de digestion et de la quantité d'enzyme utilisée pour l'expérience 1.....	35
3. Quantité de sucres réducteurs libérés par rapport au temps de digestion et à la quantité d'enzyme utilisée pour l'expérience 2.....	36
4. Poids moléculaire du pustulane digéré en fonction du temps de digestion.....	39
5. Séquence interne (pic de 74,767 min) de 12 acides aminés provenant de la protéine purifiée chez EF-14.....	41
6. Séquence interne (pic 78,258 min) de 10 acides aminés provenant de la protéine purifiée chez EF-14.....	42
7. Gènes retrouvés dans le cosmide 8A6 de <i>Streptomyces coelicolor</i>	52

LISTE DES FIGURES

1. Courbe de production de la β -1,6 glucanase par la souche EF-14.....	24
2. Courbe de production de la β -1,6 glucanase par la souche EF-14, en fermenteur.	25
3. Profil chromatographique: fractions 10-35 issues de la Macro-Prep HS.....	29
4. Profil chromatographique : fractions 30-44 issues du Bio-Gel A Medium.	30
5. Analyse par SDS-PAGE du produit purifié.....	31
6. Profil chromatographique : Fractions 8-27 issues de la colonne d'interactions hydrophobes.	32
7. Analyse SDS-PAGE 8 % des éluats de la colonne d'interactions hydrophobes.	33
8. Variation du poids moléculaire du pustulane en fonction de la progression de l'hydrolyse.....	37

9. Chromatographie sur couche mince des produits d'hydrolyse du pustulane libérés par l'action de la β -1,6 glucanase purifiée.	38
10. Carte du cosmide SC8A6.	55

INTRODUCTION

Les β -glucanes constituent la classe la plus abondante de polysaccharides principalement grâce à la présence des β -1,4 glucanes, c'est-à-dire la cellulose. Ces polymères de glucoses sont formés par des liens glycosidiques de type β entre les différents résidus monomériques. De plus, les β -glucanes sont retrouvés chez divers microorganismes et certains sont synthétisés par plusieurs champignons. Chez les plantes supérieures, ils sont présents comme entités structurales de la paroi cellulaire et sous forme de matériel de réserves vacuolaires et cytoplasmiques (Bielecki et Galas, 1991).

Selon les liens glycosidiques qui les constituent soit: β -1,3 ; β -1,4 et β -1,6, il existe différents types de β -glucanes. Ceux-ci peuvent être relativement simples, composés de macromolécules linéaires dont les liens glycosidiques sont d'un seul type comme c'est le cas pour la laminarine (β -1,3) ou encore pour la cellulose (β -1,4). En revanche, ils peuvent être d'une grande complexité lorsqu'ils possèdent plus d'un type de liens glycosidiques dans la chaîne linéaire comme ceux retrouvés dans le lichenane qui sont formés de liens de types β -1,3 et β -1,4 (Yalpani, 1988). Les β -glucanes retrouvés dans les parois cellulaires de levure sont hautement branchés et complexes, ils sont responsables de la structure et la rigidité de la cellule (Bishop *et al.*, 1960). Des études effectuées chez différentes levures ont permis de classifier les glucanes selon leur solubilité: certains sont solubles en milieu alcalin, alors que d'autres se solubilisent plutôt dans l'acide acétique. Les β -1,3 glucanes insolubles en milieu alcalin possèdent une structure hautement branchée formée de liens glycosidiques de type β -1,3 et β -1,6 et contiennent 19% de liens β -1,3 (Manners *et al.*, 1973; Bacon *et al.*, 1967). Les β -glucanes solubles en milieu alcalin comportent une très faible proportion de liens

glycosidiques de types β -1,6. De plus, les chaînes latérales de ces glucanes contiennent 15 à 20 résidus mannose. Il a été démontré chez *Saccharomyces cerevisiae*, que ce type de glucanes insolubles était relié aux mannanes, protéines de la couche externe de la paroi cellulaire, par liaisons covalentes (Kapteyn *et al.*, 1996).

Les β -1,6 glucanes se retrouvent dans la nature beaucoup moins fréquemment que les β -1,3 ou β -1,4 glucanes. En fait, très peu de β -1,6 glucanes linéaires ont été identifiés. Les plus étudiés sont le pustulane (retrouvé chez le lichen *Umbilicaria pustulata*) (Lindberg et McPherson, 1954) et le lutéane qui provient du champignon *Penicillium luteum* (Pitson *et al.*, 1996). Par contre, les liens β -1,6 glycosidiques sont fréquents dans les glucanes des levures et dans les parois cellulaires des champignons filamenteux. Il n'est donc pas surprenant que les enzymes hydrolysant ce type de liens soient communes chez ces types d'organismes (Bielecki et Galas, 1991).

Il existe plusieurs enzymes capables d'hydrolyser les β -glucanes. Celles-ci sont classées selon le type de liens β -glycosidiques clivés et selon le mécanisme d'action sur le substrat. En général, les β -1,3; β -1,4 et β -1,6-glucanases hydrolysent respectivement les liens β -1,3 β -1,4 et les β -1,6 d'un polymère. Le mode d'action sur le substrat ainsi que les produits d'hydrolyse générés, permettent de différencier deux mécanismes d'action soit endo-glucanolytique ou exo-glucanolytique (Noronha et Ulhoa, 1996). Une exo- β -glucanase agit aux extrémités non réductrices des chaînes du polymère, ce qui libère des monomères et/ou des dimères de glucose comme produits d'hydrolyse. D'autre part, une endo- β -glucanase hydrolyse le substrat en clivant au hasard les liens glycosidiques à l'intérieur de la chaîne de glucoses. Les produits d'hydrolyse sont, dans ce cas-ci, plutôt des oligomères de tailles

variées.

Dans la littérature, une autre caractéristique est décrite en ce qui concerne le mode d'action des β -glucanases sur différents substrats. En effet, Rombouts (1978) a décrit deux groupes de β -1,6 glucanases chez *Bacillus circulans* WL-12. La première montrait une activité aussi bien sur les liens glycosidiques de type β -1,6 que sur les liens β -1,3, adjacents aux liens β -1,6, compris dans les parois de levure. Ce caractère lytique confère à l'enzyme la capacité d'hydrolyser complètement les parois de levure, par son action de débranchement des chaînes latérales. De plus, en hydrolysant le pustulane soluble (β -1,6 glucane linéaire) cette β -1,6 glucanase produit du glucose, du gentiobiose et gentiotriose. Ceci révèle une faible activité spécifique pour ce substrat, comparé à l'activité démontrée sur les parois de levure.

À l'opposé de la β -1,6 glucanase lytique, la seconde décrite par Rombouts et Phaff (1976) génère du glucose et du gentiobiose comme produits finaux d'hydrolyse. Cette enzyme à caractère non lytique ne lyse que partiellement les parois de levure. En fait, elle ne coupe que les liens β -1,6 contenus dans les parois. Son action sur le pustulane est plus élevée, comparée à celle démontrée par la β -1,6 glucanase lytique.

À l'aide de ces caractéristiques, il est possible de diviser les β -1,6 glucanases en deux groupes. Ainsi, les β -1,6 glucanases à caractère lytique incluent, non seulement la β -1,6 glucanase lytique de *Bacillus circulans*, mais aussi celles purifiées chez *Acremonium persicinum* (Pitson et al., 1996), *Penicillium brefeldianum*, (Schep et al., 1984), *Rhizopus*

chinensis (Yamamoto *et al.*, 1974), *Giberella fujikuroi* (Shibata et Fukambara, 1973) et la β -1,6 glucanase de *Mucor hiemalis* (Miyazaki et Oikawa, 1976). Toutes ces β -glucanases engendrent du gentiobiose et du gentiotriose comme produits finaux d'hydrolyse du pustulane. Par contre, elles semblent démontrer une incapacité à hydrolyser le dimère de glucose en monomères, à l'exception de la glucanase de *Bacillus circulans*, qui produit, du glucose en faible quantité (Rombuts et Phaff, 1976). Par conséquent, ces β -1,6 glucanases ne démontrent pas d'activité β -glucosidase. Toutes les β -1,6 glucanases purifiées chez ces microorganismes démontrent un mécanisme endoglucanolytique et la plupart possèdent une activité sur la laminarine (β -1,3 glucane principalement linéaire, mais qui contient aussi des liaisons de types β -1,6). Le taux d'hydrolyse de la laminarine par les enzymes à caractère lytique augmente avec la quantité de liens branchés de ce substrat. Le pachyman, un substrat β -1,3 glucane linéaire insoluble, est faiblement hydrolysé par ces enzymes à caractère lytique.

Chez *Trichoderma harzianum*, un mycoparasite, la β -1,6 glucanase lytique qui a été purifiée produit seulement du gentiobiose comme produit final, contrairement aux autres β -1,6 glucanases lytiques (Lora *et al.*, 1995).

Le second groupe est constitué de β -1,6 glucanases à caractère non lytique. Ces enzymes agissent par un mode d'action endoglucanolytique et sont capables de cliver le gentiotriose en gentiobiose et en glucose. C'est le cas des β -1,6 glucanases retrouvées chez *Neurospora crassa* (Hiura *et al.*, 1987), *Acinetobacter* sp. (Katohda *et al.*, 1979), *Penicillium italicum* (Santo *et al.*, 1977) et de la β -1,6 glucanase non lytique de *Bacillus circulans* WL-12 (Rombouts *et al.*, 1978). Celle-ci produit également du gentiotriose comme produit final, ce

qui diffère des autres β -1,6 glucanases non lytiques.

En comparant les différentes propriétés physico-chimiques des β -1,6 glucanases purifiées et caractérisées, on constate que le poids moléculaire des β -1,6 glucanases d'origine fongique varie entre 31 et 50 kDa (Schep *et al.*, 1984; De la Cruz *et al.*, 1995, Pitson *et al.*, 1996) ce qui est relativement plus petit que chez les β -1,6 glucanases bactériennes, où le poids moléculaire varie de 50 à 66 kDa (Schep *et al.*, 1984, Rombouts *et al.*, 1978). De plus, la valeur de pH où l'activité enzymatique est optimale varie entre 4,2 et 6 pour toutes les β -1,6 glucanases caractérisées.

La production de β -1,6 glucanases est contrôlée par différents mécanismes de régulation. Les premiers travaux de certains chercheurs suggéraient que les β -1,6 glucanases produites par les champignons étaient présentes de façon constitutive (Reese *et al.*, 1962), alors que chez les bactéries ces enzymes seraient inductibles par les parois des levures et par les β -1,6 glucanes tel que le pustulane (Fleet et Phaff, 1974, Rombouts et Phaff 1976, Katohda *et al.*, 1979). Chez *Penicillium italicum*, la β -1,6 glucanase purifiée est bel et bien produite de façon constitutive, mais elle est aussi soumise à la répression catabolique par le glucose et par d'autres sources de carbone qui permettent sa croissance (Santos *et al.*, 1977). La répression catabolique a également été observée chez *Trichoderma harzianum* (Lora *et al.*, 1995) ainsi que chez *Acremonium persicinum* (Pitson *et al.*, 1997). Le mécanisme d'induction, quant à lui, a été documenté chez plusieurs microorganismes notamment chez *Gibberella fujikuroi* (Shibata et Fukimbara, 1995), *Trichoderma harzianum* (De la Cruz *et al.*, 1995), *Mucor hiemalis* (Miyazaka et Oikawa, 1976), *Penicillium brefeldanum* (Schep *et al.*, 1984) et *Bacillus circulans* WL-12 (Fleet et Phaff, 1974).

Des β -1,6 glucanases produites par des actinomycètes furent décrites pour la première fois, en 1996, par Valois *et al.*. Les actinomycètes sont des bactéries gram positif, filamenteuses et généralement sporulantes. Ils sont retrouvés, en quantité abondante, dans le sol habituellement comme saprophytes. Les actinomycètes sont de forts bons producteurs d'enzymes extracellulaires, ce qui leur confère un rôle important au niveau de la biodégradation des matières organiques du sol (Gilbert *et al.*, 1995). Parmi les enzymes produites, on retrouve les β -glucanases. Ils sont aussi reconnus pour la production de métabolites secondaires, particulièrement les antibiotiques (Crawford *et al.*, 1993). Effectivement, Valois *et al.*, (1996) ont isolé treize souches d'actinomycètes qui inhibaient la croissance du champignon *Phytophthora*, en produisant des métabolites secondaires et en synthétisant différentes β -glucanases, soit des β -1,3; β -1,4 et des β -1,6, qui dégradent les parois cellulaires de ce champignon.

Le genre *Phytophthora* constitue un groupe de champignons phytopathogènes de la classe des oomycètes qui s'attaquent à plusieurs types de plantes (Alexopoulos, 1979). Il peut causer des maladies foliaires, mais aussi des maladies au niveau racinaire, comme c'est le cas chez le framboisier. Cette maladie s'appelle le pourridié des racines de framboisier. Les principaux symptômes occasionnés sont observés par un manque de radicelles au niveau des racines, une chlorose marquée des feuilles à la base des tiges et des fruits de petite taille et en nombre réduit.

Le *Phytophthora* se distingue des autres champignons, étant donné que sa paroi cellulaire ne contient pas de chitine. Elle est principalement constituée des β -glucanes, qui représente 80 à 90 % du poids sec des parois (Bartnicki-Garcia, 1968). En fait, deux portions sont retrouvées dans la paroi, soit une cellulosique qui contient des liens glycosidiques de type β -1,4,

spécifiques à la cellulose, et une portion non cellulosique, contenant des liens glycosidiques de types β -1,3 et β -1,6. Cette dernière portion est la plus abondante. Des chaînes latérales de β -1,3 glucanes sont rattachées au squelette principal, constitué également par des liens de type β -1,3, et β -1,6-glycosidiques (Bartnicki-Garcia et Wang, 1983). Afin de permettre une hydrolyse complète des parois cellulaires de *Phytophthora*, la participation des β -1,3; β -1,4 et β -1,6 glucanases est requise. D'après l'architecture de la paroi cellulaire de *Phytophthora*, l'action de la β -1,6 glucanase serait essentielle, car celle-ci agirait comme enzyme de débranchement des chaînes latérales, qui causent un encombrement stérique et rendent l'accès difficile pour les autres enzymes.

L'antagonisme entre les actinomycètes et les champignons est connu pour une variété de phytopathogènes tels que *Alternaria* (Chattopadhyay et Nandi, 1982), *Rhizoctonia* (Merriman *et al.*, 1974, Rothrock et Gottlieb, 1984), *Verticillium* (Wadi *et al.*, 1985), *Macrophomina* (Hussain *et al.*, 1990) et *Fusarium* (Sabaou et Bounaga, 1987). D'autres chercheurs ont établi que l'antagonisme entre plusieurs espèces de streptomycètes et des phytopathogènes, comme *Pythium* et *Phytophthora* était causé par la production d'antibiotiques (Broadbent *et al.*, 1971; Knauss, 1976). La production d'antibiotiques serait en grande partie responsable du contrôle biologique selon Crawford (1993). Chez les treize souches d'actinomycètes sélectionnées par Valois *et al.*, (1996), onze semblaient protéger les plantes de framboisier contre *Phytophthora fragariae* var. *rubi*. Une étude effectuée par Toussaint *et al.*, (1997), a démontré que toutes ces souches inhibaient également la croissance du champignon *Pythium ultimum*. De plus, une des souches inhibitrices, *Streptomyces* sp. EF-76, a été caractérisée plus en détail. Celle-ci a été identifiée comme étant le *Streptomyces hygrosopicus* var. *geldanus*, et produisait un antibiotique la geldanamycine (Toussaint *et al.*, 1997).

Actuellement, au Canada, seulement deux produits sont homologués pour diminuer la prolifération de *Phytophthora*, l'Erridomil (métalaxyl) et l'Aliette (fosetyl-AI). L'Erridomil n'est pas un fongicide à l'égard de *Phytophthora*, mais plutôt un produit qui ne fait qu'inhiber la croissance du champignon et la germination du mycélium, sans toutefois le tuer (Thibodeau, 1991). La demi-vie de l'Erridomil est évaluée de deux semaines à quelques mois selon le type de sol (Thibodeau, 1991), ainsi pour une efficacité maximale son utilisation doit être répétée. De plus, en 1990, des souches de *Phytophthora fragariae* var *fragariae* (agent causal de la stèle rouge du fraisier) résistantes au métalaxyl avaient déjà été observées (Nickerson, 1990). Pour ce qui est de l'Aliette, il a été homologué que tout récemment (1998) contre le pourridié des racines du framboisier et contre la stèle rouge du fraisier (1999) (Letendre¹). Cependant, son efficacité contre *Phytophthora* a été démontré sur plusieurs végétaux ; la tomate (Flett *et al.*, 1991), la vigne (Fernando et Linderman, 1994), la pomme (Utkhede et Smith, 1991) et l'avocat (Mourichon *et al.*, 1984). Ce produit agit aussi de façon systémique. En Europe, une firme finlandaise a élaboré un biofongicide à base de cellules vivantes de *Streptomyces griseoviridis*, un actinomycète. Ce biofongicide protège les plantes contre l'infection par *Fusarium* et par *Alternaria* (Lahdenpera *et al.*, 1991).

La production d'enzymes extracellulaires pourrait également jouer un rôle dans le contrôle biologique des champignons phytopathogènes. En effet, il a été rapporté qu'il existerait une corrélation entre la production de β -1,3 glucanases et de chitinases chez *Trichoderma harzianum* et le contrôle biologique *in vivo* de *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* et *Pythium aphanidermatum* (Artigues et Davet, 1984; Elad *et al.*, 1982). Valois *et al.*, (1996),

⁽¹⁾ Communication personnelle orale, mars 2000.

de la paroi cellulaire de *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, et diminuaient ainsi la fréquence de la maladie. Chez EF-14, un streptomycète capable de lyser le mycélium du phytopathogène, plusieurs enzymes sont produites, dont la β -1,6 glucanase. C'est cette enzyme qui attire notre attention pour ce projet afin de mieux comprendre son mécanisme d'action et son implication dans le phénomène d'antagonisme envers *Phytophthora*. Des récents travaux effectués dans notre laboratoire ont permis de caractériser brièvement la β -1,6 glucanase de EF-14. Ainsi le poids moléculaire de cette protéine serait estimé à 65 kDa, le pH optimal à 5,5 et la température optimale de cette enzyme serait de 50⁰ Celcius (Fayad, 1997).

Malgré le peu d'information retrouvé dans la littérature concernant les β -1,6 glucanases, des applications autres que la lutte biologique pourraient être assignées à la β -1,6 glucanase. Selon Kofod *et al.*, (1998), la pustulanase pourrait servir à extraire des mannoprotéines à partir des parois cellulaires de levure. De plus, en viticulture, la filtration du vin pourrait être améliorée par l'ajout de β -1,6 glucanases, car elles empêcheraient la croissance de champignons comme *Botrytis cinerea* qui infecte les grappes de raisin. Étant donné que plusieurs types de parois cellulaires contiennent des β -1,6 glucanes, la β -1,6 glucanase pourrait être utile dans la lyse enzymatique de la paroi pour permettre de récupérer plus facilement des produits synthétisés par des microorganismes (vitamines, stabilisateurs, émulsifiants et protéines) (Kofod *et al.*, 1998). Aussi les β -1,6 glucanases pourraient être utilisées pour la production de protoplastes de levures et de champignons qui sont très utiles dans les études de fusion, transformation et de clonage (Hamlyn *et al.*, 1981). De plus, ces enzymes pourraient être ajoutées dans des rinces bouche pour combattre la plaque dentaire. En effet, la plaque dentaire est composée de plusieurs polysaccharides.

À l'heure actuelle, dans la littérature on retrouve seulement un gène codant pour une β -1,6 glucanase qui a été caractérisé du point de vue moléculaire soit, cloné et séquencé. Celui-ci provient du mycoparasite *Trichoderma harzianum* (Lora *et al.*, 1995). Aucune β -1,6 glucanase bactérienne n'a donc été caractérisée du point de vue moléculaire. Ce qui augmente l'intérêt de notre étude, qui permettrait de purifier et de caractériser moléculairement la β -1,6 glucanase de EF-14.

Le but général de ce projet de recherche était d'établir un protocole de purification de la β -1,6 glucanase du streptomycète EF-14, souche capable de lyser complètement le mycélium de *Phytophthora*, élucider son mode d'action sur le substrat et de déterminer la séquence de la portion N-terminale de la protéine ainsi que des séquences internes. Nous présenterons donc, la production, la purification et la caractérisation de cette enzyme.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1 Souches de microorganismes

La souche utilisée pour la purification de la β -1,6 glucanase est EF-14, un actinomycète non pathogène isolé de la rhizosphère de la pomme de terre dans notre laboratoire (Faucher *et al.*, 1992).

1.2 Milieux de culture

Le milieu YME (Yeast Malt Extract) liquide tel que décrit par Pridham *et al.*, 1956-57 a servi à faire croître EF-14 à 30°C. Le milieu YME agar a été utilisé pour la production de spores de l'actinomycète EF-14. Le milieu de culture ayant servi à faire croître EF-14 à 30°C, fut également YME.

Le milieu élaboré pour la production de la β -1,6 glucanase est constitué de 0.5% de cellules lyophilisées de la levure *Candida utilis* (Sigma), comme seule source de carbone, dans l'eau.

Celle-ci était supplémentée, après autoclavage, de 1/10 du volume d'une solution de sels pour milieu minimum concentrée 10 fois, soit: 5g/L de K_2HPO_4 ; 2g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1g/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ et 10g/L de $(NH_4)_2SO_4$.

1.3 Production de la β -1,6 glucanase

Pour pouvoir être utilisées comme inoculum lors de la production de l'enzyme, les spores de EF-14 devaient être assez jeunes, soit âgées de 2 à 4 semaines. Ces spores avaient été récoltées auparavant, à l'aide de billes de verre et gardées à $-20^{\circ}C$ dans 20% de glycérol. Elles étaient inoculées dans 50 ml de milieu YME en erlenmeyer d'une capacité de 250 ml, pour une période de 12 à 15 heures, à une température de $30^{\circ}C$. Ensuite, une petite quantité (300-500 μ l) était repiquée dans 200 ml de YME frais en erlenmeyer de 1 litre pendant 9 à 10 heures, toujours à $30^{\circ}C$. Le tout était centrifugé dans des tubes coniques de 50 ml à une vitesse de 4000 rpm, pendant 5 minutes. Puis, chaque culot de bactéries était resuspendu dans 10 ml de NaCl 0,85 % (saline physiologique) et servait d'inoculum pour la production de la β -1,6 glucanase dans 1 litre de milieu de production. Le tout était incubé à $30^{\circ}C$ avec agitation pour une durée de 12 heures. La production de l'enzyme était arrêtée en ajoutant 2,5 mM d'EDTA, pH 8.

1.3.1 Production de la β -1,6 glucanase en fermenteur

Pour la production en fermenteur, 4 litres de milieu de production étaient préparés, auxquels on ajoutait 10 ml d'antimousse A 40. Les précultures étaient toutes effectuées dans les conditions décrites à la section 1.3, par contre la seconde préculture avait un volume de 800 ml.

Lors de la production de la β -1,6 glucanase par EF-14, le moteur du fermenteur était réglé à une vitesse de 350 rpm durant les 4 premières heures. Par la suite, on augmentait la vitesse à 450 rpm. La température était constamment maintenue à 30°C. La production était surveillée de près, un échantillon de 5 ml était prélevé à toutes les heures et les sucres réducteurs étaient dosés selon la méthode décrite à la section 1.4.2. Après 10 à 12 heures d'incubation, la culture était arrêtée et la surnageant était supplémenté d'EDTA 2,5 mM.

1.4 Dosage de l'activité β -1,6 glucanase

1.4.1 Préparation du substrat

Le pustulane a d'abord été soumis à une réduction terminale (Schep *et al.*, 1984). Cette procédure a été effectuée dans le but d'abaisser les valeurs des échantillons de référence pour la détermination de la quantité de sucres réducteurs. Elle consiste à réduire les groupements

réducteurs terminaux dans les chaînes polysaccharidiques du pustulane. Le protocole élaboré consistait à dissoudre un gramme de pustulane dans un volume minimal d'eau avec 0,3 g de NaBH_4 et de bouillir pendant 10 minutes. Le mélange était ensuite neutralisé avec de l'acide acétique glacial. Le pustulane réduit était ensuite précipité en ajoutant 10 volumes d'éthanol 95%. Le mélange fut gardé à -20°C pendant 2 heures. Le tout a été centrifugé à une vitesse de 3000 rpm durant 5 minutes et le culot a été lavé 5 fois avec 5 ml de méthanol. Par la suite, le culot lavé fut dissous dans 5 ml d'eau et précipité encore une fois à l'éthanol 95%. Le culot récupéré était séché à l'air et resuspendu dans de l'eau. La concentration finale était de 5 mg/ml de pustulane. Lors du dosage de l'activité ce pustulane était utilisé à raison de 2,5 mg/ml dans un tampon acétate de sodium 50 mM ajusté à un pH de 5,5.

1.4.2 Détermination des sucres réducteurs à l'aide du réactif PAHBAH

Le réactif PAHBAH 0,25 % (acide p-hydroxy-benzoïque hydrazide) est composé de 1ml de chacune des solutions suivantes; 1 M de Na_2SO_3 ; 0,2 M de CaCl_2 ; 0,5 M de citrate trisodique et de 5 M de NaOH. Ce mélange était par la suite, complété à 20 ml avec de l'eau distillée et 0,05 g de PAHBAH y était ajouté. Comme ce réactif est stable pour 2 heures, il devait donc être préparé immédiatement avant usage.

Pour effectuer la réaction enzymatique, on additionnait 490 μl de substrat pustulane avec 10 μl d'échantillon contenant l'enzyme. L'échantillon devait être dilué de manière à obtenir, suite à la réaction et au dosage des sucres réducteurs, une absorbance entre 0,01 et 1 à une

longueur d'onde de 405 nm. La réaction enzymatique se déroulait à 50°C pendant 10 minutes. Pour arrêter cette réaction, 1ml de réactif PAHBAH était ajouté. Le tout était chauffé à 100°C, pendant 10 minutes. Un échantillon de référence contenant 500 µl de substrat pustulane et 1 ml de réactif PAHBAH était aussi préparé. Une fois les tubes de réaction refroidis sur la glace, l'adsorbance était lue à une longueur d'onde de 405 nm. Pour calculer l'activité enzymatique, la quantité de sucres réducteurs exprimée dans l'échantillon de référence était soustraite de celle dosée dans l'échantillon réactionnel.

1.4.3 Définition de l'unité d'activité enzymatique

Une unité d'activité de β -1,6 glucanase est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour relâcher 1 µmole de sucres réducteurs par minute, à 50°C.

1.4.4 Dosage des protéines totales

La concentration en protéines totales fut déterminée selon la méthode de Bradford (1976), à l'aide du réactif "Bio-Rad Protein Assay" (Bio-Rad). Cette détermination se faisait directement dans des cuvettes de spectrophotomètre, où 800 µl d'échantillon, dilué ou non, étaient mélangés à 200 µl de réactif et incubés 5 minutes à la température de la pièce. La densité optique était lue à 595 nm et elle devait avoir une valeur entre 0,1 et 0,6.

L'échantillon pouvait donc être dilué de façon à obtenir ces valeurs. Une référence (zéro du spectrophotomètre) était obtenue en ajoutant 200 µl de réactif à 800 µl d'eau.

1.5 Purification de la β -1,6 glucanase chez EF-14

Afin d'obtenir le surnageant contenant l'enzyme à purifier, la culture bactérienne a été filtrée sur une membrane de papier avec des pores d'une grosseur de 12 µm (15 cm) (Aldrich) pour une première étape de filtration puis sur un filtre en microfibres de verres de 1 µm (12 cm) (MSI). Par la suite, le surnageant était ajusté goutte à goutte à un pH de 4.4 avec de l'acide acétique glacial. Il est à noter que toutes les étapes de purification se sont déroulées à une température de 4 °C afin de maximiser la stabilité de l'enzyme. Les étapes de purification par HPLC (chromatographie liquide à haute performance) ont quant à elles, été effectuées à la température ambiante. Ceci était acceptable, vu leur très courte durée (30 minutes).

1.5.1 Précipitation à l'éthanol

La β -1,6 glucanase a été précipitée à l'éthanol, à 4°C. L'éthanol 95% a été ajouté goutte à goutte à l'aide d'une pompe péristaltique dans un rapport final de 3:1. À la suite de la précipitation, le mélange était centrifugé à 4000 rpm pendant 20 minutes, à une température de 4°C. Le culot était ressuspendu dans un volume minimal de tampon acétate de sodium de 50 mM, pH 4,4 additionné de 2,5 mM d'EDTA à pH 8. Cette solution enzymatique pouvait directement être utilisée pour la première étape de purification.

1.6 Purification par chromatographie

La première étape de purification consistait en une chromatographie sur colonne à échange ionique (cationique) de 2,6 x 8 cm. La résine utilisée fut une Macro-Prep High S (Bio-Rad). Cette résine était équilibrée avec un tampon acétate de sodium de 50 mM à pH 4,4, supplémenté de 2,5 mM d'EDTA, pour augmenter la stabilité de l'enzyme. Après l'adsorption de l'enzyme sur la résine, cette dernière a été lavée avec 200 ml de ce même tampon. L'élution s'est effectuée à l'aide de 400 ml d'un gradient linéaire de NaCl 0-500 mM dans le même tampon. Le tout s'est déroulé à un débit de 80 ml/heure. Des fractions de 5 ml ont été recueillies et l'activité β -1,6 glucanase y a été dosée selon la méthode décrite à la section 1.4.2.

Les fractions actives ont été regroupées et diluées dans 2 volumes d'eau distillée pour ramener la force ionique à celle du tampon d'équilibre. L'échantillon a ensuite été appliqué sur une colonne de concentration, contenant la même résine que la première colonne, mais de dimensions réduites (2,6 x 3 cm). La colonne a été lavée avec 200 ml de tampon acétate de sodium 50 mM à pH 4,4 contenant 2,5 mM d'EDTA. Les protéines ont été éluées de façon isocratique avec 200 ml du même tampon additionné de NaCl 300 mM. Le débit était de 80 ml/heure et les fractions récoltées avaient un volume de 4 ml. Après cette étape de concentration, les fractions montrant toujours une activité β -1,6 glucanase, ont été déposées sur une colonne de filtration sur gel.

Cette colonne (1,6 x 98 cm) contenait un gel d'agarose de type Bio-Gel A 0,5m médium (Bio-Rad). Celle-ci fut préalablement équilibrée avec un tampon contenant 100 mM d'acétate de sodium à pH 5,5 ainsi que 2,5 mM d'EDTA. Le débit de cette colonne était de 15 ml/heure et des fractions de 5 ml étaient recueillies.

Les fractions actives furent réunies et diluées dans 2 volumes d'eau distillée et le pH fut abaissé à 3,9 avec l'acide acétique glacial. Cet échantillon fut injecté à l'aide d'une boucle de 5 ml, dans une colonne à échange cationique (Polysulfoethyl A). Cette colonne HPLC fut préalablement équilibrée avec un tampon d'acétate de sodium 50 mM à pH 3,9, sous une pression de 26 atm. L'élution s'est effectuée à la même pression avec un gradient de NaCl allant de 0 à 600 mM dans un tampon acétate de sodium 50 mM, pH 3,9. Des fractions correspondantes à un pic protéique détecté à une densité optique de 280 nm étaient recueillies. Les fractions démontrant une activité β -1,6 glucanase ont été regroupées et injectées dans une dernière colonne HPLC. Pour cette étape de purification par HPLC, nous avons utilisé une colonne TSK Gel-125 (Bio-Rad), laquelle était équilibrée avec un tampon acétate de sodium de 50 mM, à pH de 5,5. La récupération des protéines s'est effectuée à l'aide de ce même tampon et à une pression de 36 atm. Des fractions de 0,5 à 1 ml ont été récoltées. Un dosage de l'activité nous a permis de détecter les fractions intéressantes. Celles qui démontraient une activité β -1,6 glucanase ont, par la suite, été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS.

D'autres supports chromatographiques ont été essayés, tel que l'hydroxyapatite (Bio-Rad). En fait, plusieurs essais ont été effectués avec différents tampons de colonne (NaCl 1mM et Tampon acétate de sodium 5 mM à pH 5,5 et 5,8) et tampons d'élution (gradient de phosphate de sodium allant de 1 à 300 mM, gradient de $MgCl_2$ allant de 1 mM à 5 mM,

gradient de NaCl de 1 mM à 1 M, gradient de tampon acétate 5 mM et du tampon phosphate 300 mM). L'option qui semblait la plus prometteuse était, une colonne d'hydroxyapatite équilibrée avec du NaCl 1mM. Les protéines étaient dialysées contre du NaCl 1 mM, à l'aide de sacs à dialyse (Gibco). Par la suite elles étaient appliquées sur la colonne. Un prélavage a été fait avec du tampon phosphate de sodium de 1 mM à pH 6,8. L'élution s'est effectuée dans un gradient de phosphate de sodium allant de 1mM à 30 mM de 40 ml.

Une colonne à interactions hydrophobes a aussi été employée, la résine utilisée était une Macro-Prep t-butyl (Bio-Rad). Celle-ci fut équilibrée avec du tampon acétate de sodium d'une concentration de 25 mM additionné de 0,75 M de sulfate d'ammonium. Les protéines étaient éluées à l'aide d'un tampon acétate contenant un gradient inversé de sulfate d'ammonium de 0,75 mM à 0 mM. Le volume de ce gradient était de 100 ml. L'activité β -1,6 glucanase a été estimée dans chacune des fractions récoltées selon la méthode décrite en 1.4.2.

1.7 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE)

La méthode de Laemmli (1970) a été utilisée pour l'analyse des protéines à toutes les étapes de purification. Les protéines étaient précipitées au méthanol dans un rapport volumétrique de 2 :1 durant toute la nuit à -20° Celcius. Ensuite le culot de protéines était dissous dans le tampon de chargement. Les protéines ont été séparées sur un gel de 10 % en polyacrylamide. Les protéines ont été visualisées grâce à la coloration au bleu de Coomassie R-250. Par contre, lorsque les protéines étaient en faible quantité, la méthode de coloration au nitrate

d'argent était employée. Celle-ci peut révéler des quantités de l'ordre de 0,1 à 100 ng (Bio-Rad). Une échelle de faibles poids moléculaires (Bio-Rad) a été employée pour déterminer le poids moléculaire des protéines.

1.8 Digestions de pustulane

Pour une meilleure caractérisation biochimique de l'enzyme, deux expériences d'hydrolyse du substrat ont été réalisées (c'est-à-dire, 2,5 mg de pustulane par ml de tampon acétate de sodium 50 mM, pH de 5,5). La première se déroulait à une température de 50°C et 50 mU de l'enzyme purifiée ont été utilisés pour chaque échantillon hydrolysé. Différents temps d'incubation ont été expérimentés soit: 30, 60, 90 minutes, 6 heures et 24 heures. Les échantillons étaient ensuite chauffés dans un bain marie à 100°C, pendant 10 minutes, afin d'inactiver l'enzyme. Le niveau de sucres réducteurs était ensuite déterminé dans chaque hydrolysats. Les produits découlant de l'hydrolyse du substrat ont ensuite été analysés par chromatographie sur couche mince.

1.8.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les produits d'hydrolyse du pustulane par la β -1,6 glucanase ont aussi été étudiés par chromatographie sur couche mince. Ils furent appliqués sur une plaque de silice, Silica Gel G

(Whatman) à raison de 30 µl par digestion. Les témoins utilisés étaient le glucose et le gentiobiose (Sigma), tous les deux à une concentration de 4 mg/ml. Un volume de 4 µl de chaque témoin fut déposé la plaque de silice. Le solvant de migration qui fut utilisé était composé de n-butanol, de l'éthanol et de l'eau dans un rapport de (5:3:2). Après la migration, on laissait la plaque sécher quelques minutes avant de procéder au développement. Le révélateur employé contenait, quant à lui, de l'éthanol 95 %, de l'acide sulfurique et de l'anisaldéhyde dans un rapport de (9:0,5:0,5) (Stahl et Kaltenbach, 1961). Il a été pulvérisé avec une faible pression grâce à une pompe. Lorsque la plaque fut sèche, elle fut chauffée dans un incubateur à 90°C, pendant environ 10 minutes.

La seconde expérience consistait, encore une fois, à l'hydrolyse du substrat pustulane mais la température de réaction était de 30°C. La quantité de sucres réducteurs a été évaluée à l'aide du réactif PAHBAH 0,25 %. Les différents hydrolysats ont été analysés par le HPLC.

1.9 Analyse des produits de digestion par HPLC

L'analyse par HPLC fut effectuée sur un appareil Varian Vista 5500 relié à un détecteur à dispersion lumineuse par évaporation (Sedex modèle 55). La température du détecteur était ajustée à 38°C. Deux types de colonnes ont été employées pour l'analyse des produits de digestion du pustulane. Une première filtration sur gel était effectuée pour déterminer les oligomères de grande taille. Cette étape consistait en deux colonnes (Supelco) branchées en série soit : une Progel-TSK-G4000 PWXL (7,8 mm x 30 cm) suivie par une Progel-TSK-

G3000 PWWL (7,8 mm x 30cm). L'élution fut effectuée à température ambiante avec l'aide d'un tampon de 500 mM d'acétate d'ammonium, pH 5. La vitesse d'élution était de 0,7 ml/min. On a procédé à une seconde filtration sur gel pour déterminer la production de monomères et dimères de glucose, pour ce faire une colonne de Progel-TSK G-oligo-PW (7,8 mm x 30 cm) (Supelco) fut employée. L'élution fut effectuée à l'aide du même tampon toujours à une vitesse de 0,7 ml/min.

1.10 Séquences internes de la β 1,6-glucanase

Deux séquences d'acides aminés internes de la protéine purifiée ont été déterminées par séquençage automatique au Service de séquençage de peptides de l'est du Québec (Centre de recherche du CHUL). Les séquences ont été effectuées par le docteur Sylvie Bourassa.

RÉSULTATS

2.1. Production de la β -1,6 glucanase par la souche EF-14

Le but de ce projet étant la purification de la β -1,6 glucanase produite chez la souche EF-14, un milieu de production a été élaboré afin d'obtenir une quantité suffisante d'enzyme pour les étapes de purification. À la suite de 12 heures d'incubation, le maximum de production de la β -1,6 glucanase était atteint. Ceci est représenté à la figure 1. L'activité enzymatique maximale du surnageant de culture obtenue était de 0,488 U/ml. Cette première mise au point des conditions de culture avait été effectuée pour 500 ml de milieu. Par la suite, afin d'obtenir une grande quantité d'enzyme purifiée, nous avons optimisé les conditions de culture de la β -1,6 glucanase par la souche EF-14, en fermenteur.

2.2 Production de la β -1,6 glucanase par la souche EF-14, en fermenteur

Un volume de cinq litres de milieu de production fut utilisé pour cette étape. Après 10 à 12

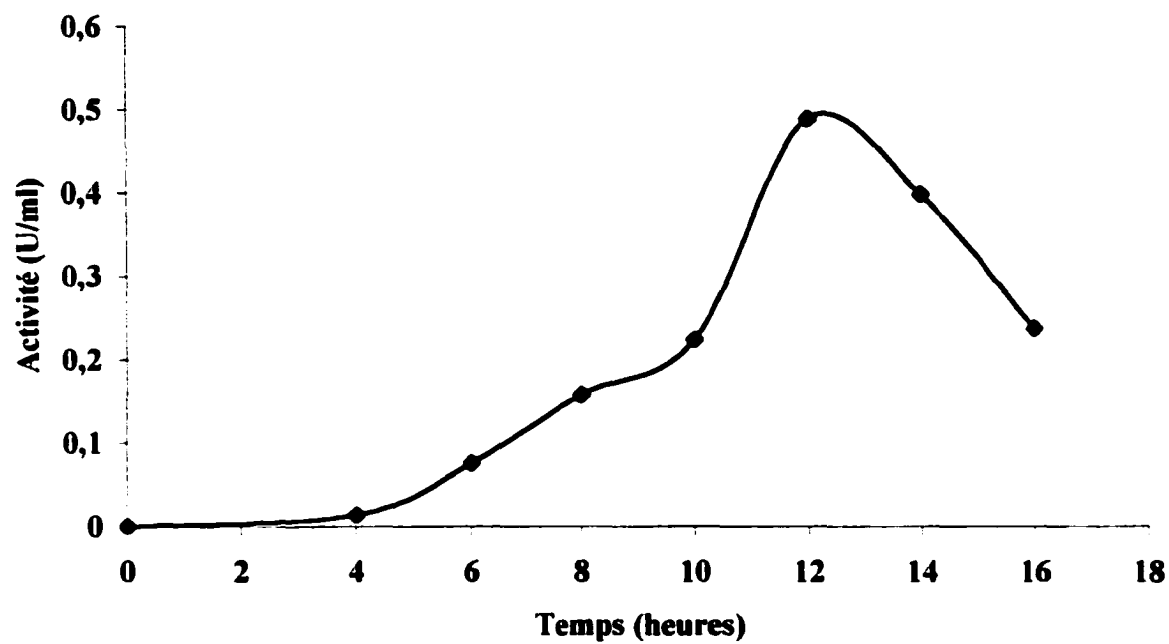


Figure 1. Courbe de production de la β -1,6 glucanase par la souche EF-14.

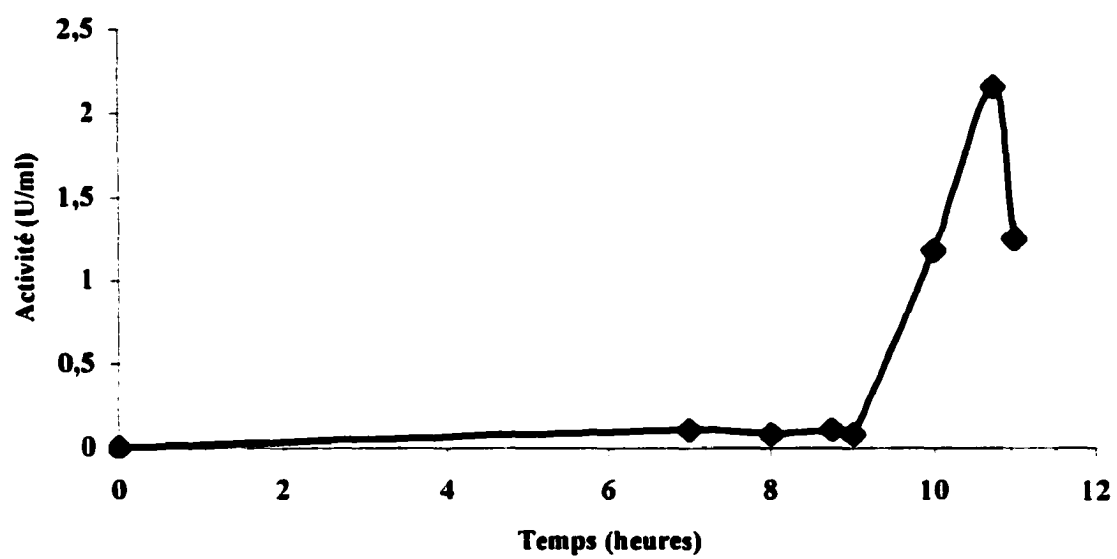


Figure 2. Courbe de production de la β -1,6 glucanase par la souche EF-14, en fermenteur.

heures de production de la β -1,6 glucanase par la souche EF-14, la quantité maximale était atteinte. De plus à la figure 2, on peut voir que l'activité enzymatique maximale obtenue après 10 heures de production était de 2,106 U/ml. Il est important de noter la diminution rapide d'activité au-delà de 12 heures de production. La souche EF-14 étant une excellente productrice de l'enzyme désirée, nous avons donc entrepris sa purification.

Suite à la filtration du surnageant de culture, celui-ci a été précipité avec 3 volumes d'éthanol. Cette étape permettait une certaine purification étant donné, qu'elle éliminait un ou des polysaccharides brunâtres qui ne précipitaient pas, contrairement aux protéines contenues dans le surnageant de culture.

Quatre étapes de purification sur colonne ont été nécessaires à l'obtention d'un produit purifié. La première étape consistait en une colonne échangeuse de cations (Macro-Prep HS). Le profil d'élution représenté à la figure 3, montre une bonne séparation où toutes les protéines qui démontrent une activité sont regroupées et forment un pic. Le maximum d'activité enzymatique (U/ml) est observé dans la fraction numéro 25.

La filtration sur gel constituait la seconde étape de purification. Le profil chromatographique du Bio-gel A Medium est représenté à la figure 4. Un maximum d'activité β -1,6 glucanase (U/ml) se situe dans la fraction numéro 37. Ces deux premières étapes de chromatographie s'effectuaient de façon classique, alors que les deux dernières étapes s'effectuaient à l'aide du HPLC.

À la figure 5, on peut voir sur un gel SDS-PAGE le produit purifié obtenu après toutes les étapes de purification. On peut remarquer que suite aux quatre étapes chromatographiques, il existe encore quelques bandes protéiques contaminantes. Le produit purifié a été visualisé en SDS-PAGE et la bande de 65 kDa correspondante à la β -1,6 glucanase a été découpée (figure 5).

Le tableau 1 résume les paramètres de purification propres à l'échantillon de départ (surnageant de culture) et au produit purifié. L'activité spécifique de l'enzyme purifiée est de 17,045 U/mg, avec un degré de purification de 1,6 fois et une quantité de 97,1 μ g de protéines purifiées. Le rendement est de 0,125%.

Étant donné que le produit purifié semblait contenir la β -1,6 glucanase de EF-14 ainsi que d'autres protéines, divers principes chromatographiques ont été expérimentés pour séparer les protéines et ainsi obtenir une meilleure purification. La figure 6 illustre le profil chromatographique d'une colonne à interactions hydrophobes (T-Butyl HIC support), on peut voir 3 pics où l'activité enzymatique est élevée, un premier à la fraction numéro 13, un second à la fraction 17 et un dernier à la fraction 21. De plus, la figure 7 démontre une analyse par SDS-PAGE des produits obtenus suite à l'élution de cette colonne d'interactions hydrophobes. Chaque éluat contient des concentrations différentes de sulfate d'ammonium.

Tableau 1. Purification de la β -1,6 glucanase de *Streptomyces* sp. EF-14

	Surnageant de culture	Polysulfoethyl A (HPLC)
Activité (U/ml)	0,421	2,25
Protéines totales (μ g)	77 320	97,1
Activité spécifique (U/mg)	10,89	17,045
Rendement (%)		0,125
Degré de purification	1	1,6

Un autre type de support chromatographique fut testé soit l'hydroxyapatite. Les protéines s'éluèrent grâce à un faible gradient de tampon phosphate. Celles-ci se détachaient de la colonne à l'aide d'une très faible quantité de phosphate, c'est-à-dire au tout début du gradient.

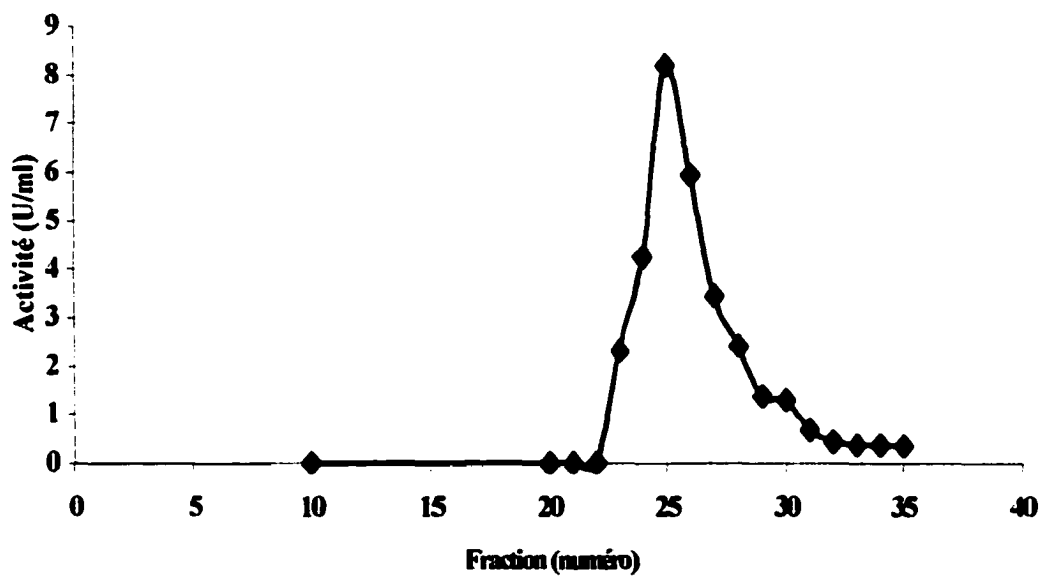


Figure 3. Profil chromatographique: fractions 10-35 issues de la Macro-Prep HS.

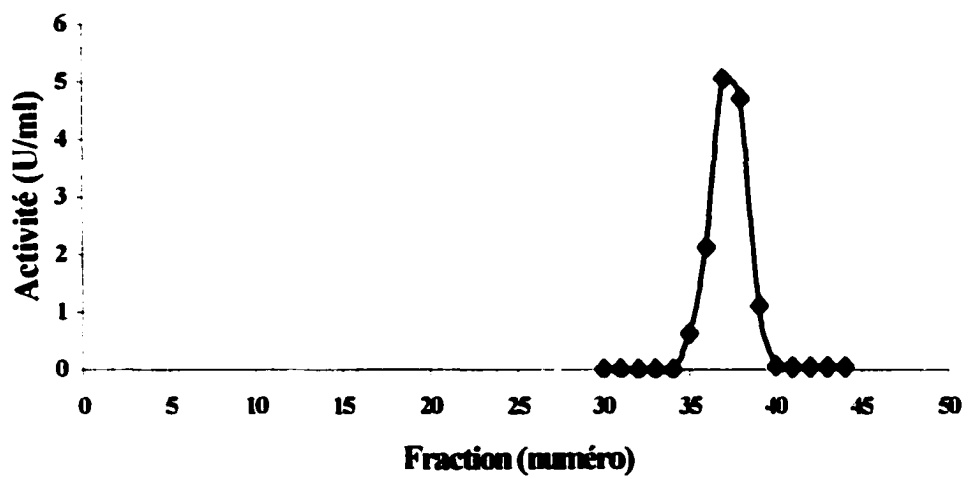


Figure 4. Profil chromatographique : fractions 30-44 issues du Bio-Gel A Medium.

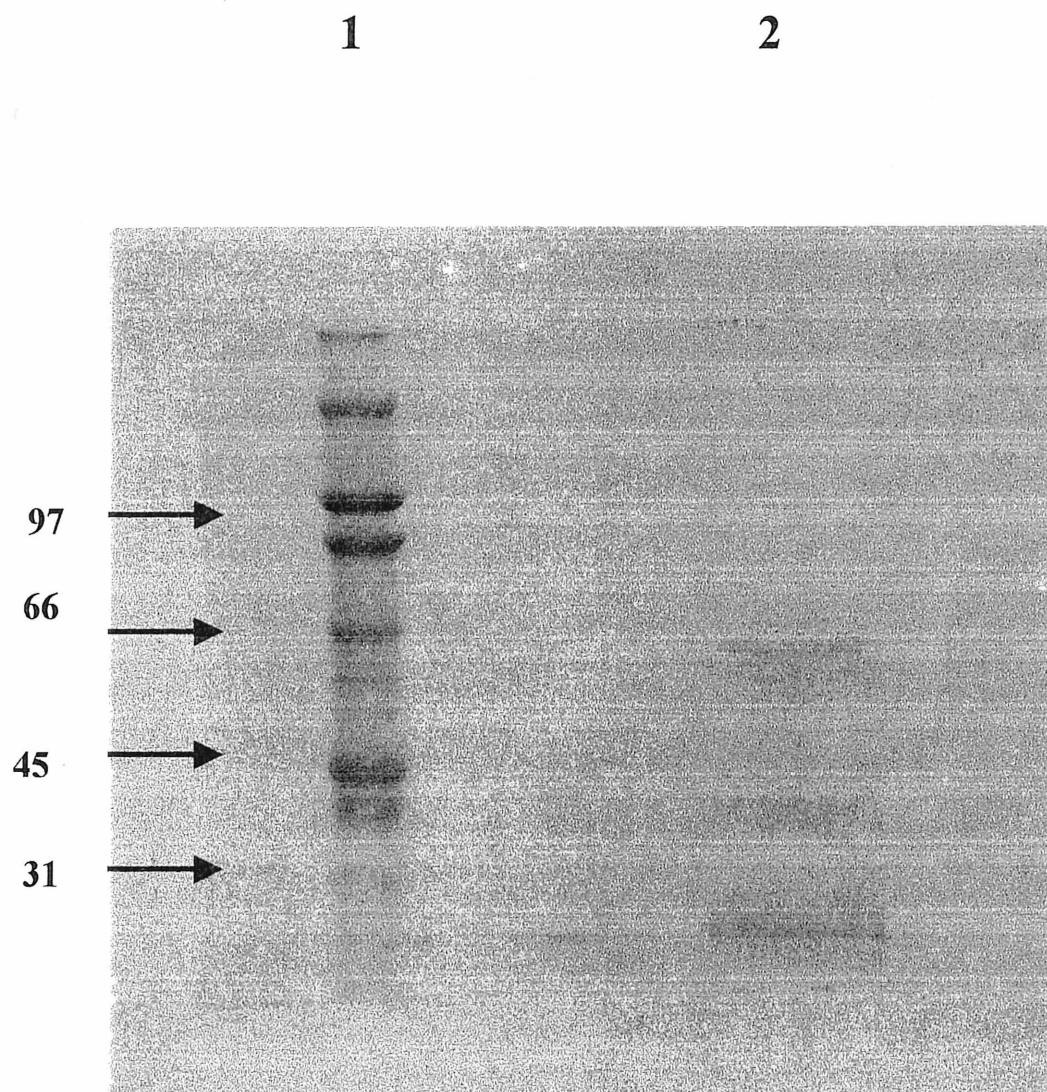


Figure 5. Analyse par SDS-PAGE du produit purifié.

1 : Marqueurs de poids moléculaire (en kDa)

2 : Échantillon purifié

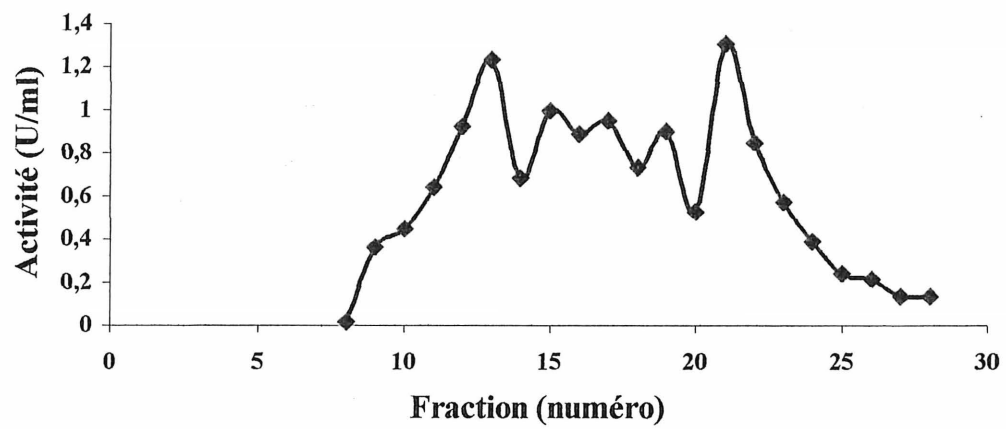


Figure 6. Profil chromatographique : Fractions 8-27 issues de la colonne d'interactions hydrophobes.

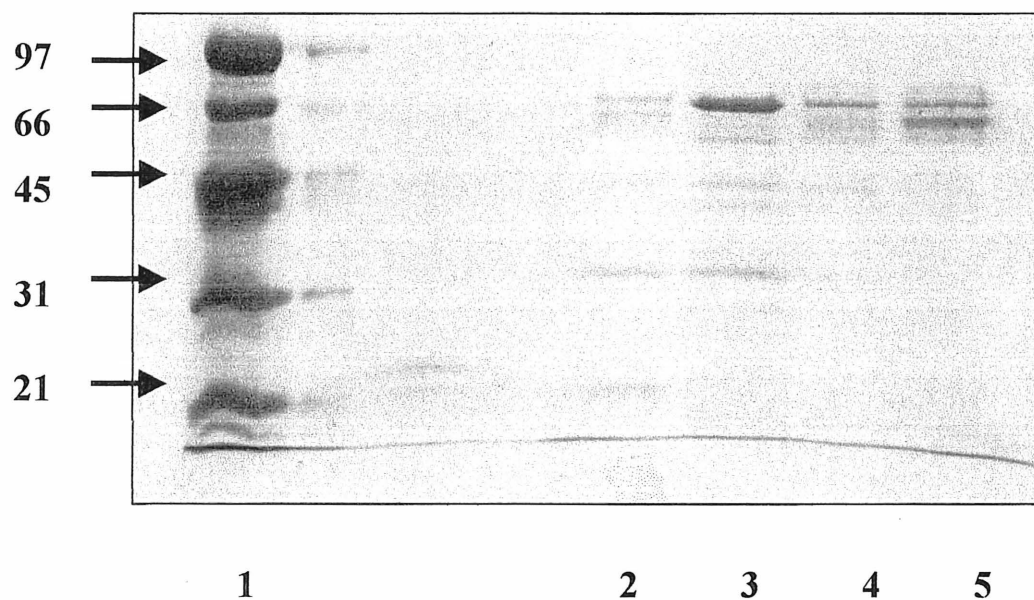


Figure 7. Analyse SDS-PAGE 8 % des éluats de la colonne d'interactions hydrophobes.

- 1 : Marqueurs de poids moléculaire (en kDa)
- 2 : éluat de la colonne Macro-prep
- 3 : éluat contenant 0,6 mM de sulfate d'ammonium
- 4 : éluat contenant 0,48 mM de sulfate d'ammonium
- 5 : éluat contenant 0,35 mM de sulfate d'ammonium

2.4 Mécanisme d'action de la β -1,6 glucanase purifiée chez *Streptomyces* sp. EF-14

Des digestions partielles du substrat pustulane ont été effectuées à l'aide de la β -1,6 glucanase purifiée. Deux expériences furent réalisées, la première qui s'est déroulée à une température de 50° Celsius montrait que la quantité de sucres réducteurs libérés augmentait avec le temps de réaction. Ainsi pour cette expérience, la quantité de sucres réducteurs estimée par la méthode utilisant le réactif PAHBAH 0,25 % est exposée dans le tableau 2.

L'analyse de ces produits de digestions du pustulane par chromatographie sur couche mince (CCM) a démontré la séparation des oligosaccharides de haut poids moléculaire générés suite à la digestion (figure 9). La CCM a permis d'observer en premier lieu, la libération d'oligomères de grande taille et la libération de gentiobiose après 20 minutes avec 60 mU de β -1,6 glucanase. Après 40 minutes de digestion, on note la production de glucose (figure 9). Au fur et à mesure que la réaction se déroulait, les oligosaccharides de haut poids moléculaire étaient scindés en gentiobiose et en glucose qui représentent donc les produits finaux d'hydrolyse.

Tableau 2. Quantité de sucres réducteurs relâchés par rapport au temps de digestion et de la quantité d'enzyme utilisée pour l'expérience 1.

Quantité d'enzyme utilisée (mU)	Temps de réaction (minutes)	Quantité de sucres réducteurs relâchés (μ moles/ 500 μ l)
25	10	0,102
50	10	0,153
50	17 heures	0,916
60	20	0,514
60	40	0,721

La seconde expérience sur le mécanisme d'action de la β -1,6 glucanase consistait aussi en des digestions partielles de pustulane par l'enzyme purifiée à une température de 30° C. Le dosage des sucres réducteurs de cette expérience montre encore une fois, que la quantité de sucres libérés augmente avec le temps d'incubation (Tableau 3). Ces échantillons ont par la suite été analysés par HPLC.

Tableau 3. Quantité de sucres réducteurs libérés par rapport au temps de digestion et à la quantité d'enzyme utilisée pour l'expérience 2.

Quantité d'enzyme utilisée (mU)	Temps de digestion (minutes)	Quantité de sucres réducteurs libérés (μ moles/500 μ l)
50	30	0,087
50	60	0,191
50	90	0,404
50	6 heures	1,33

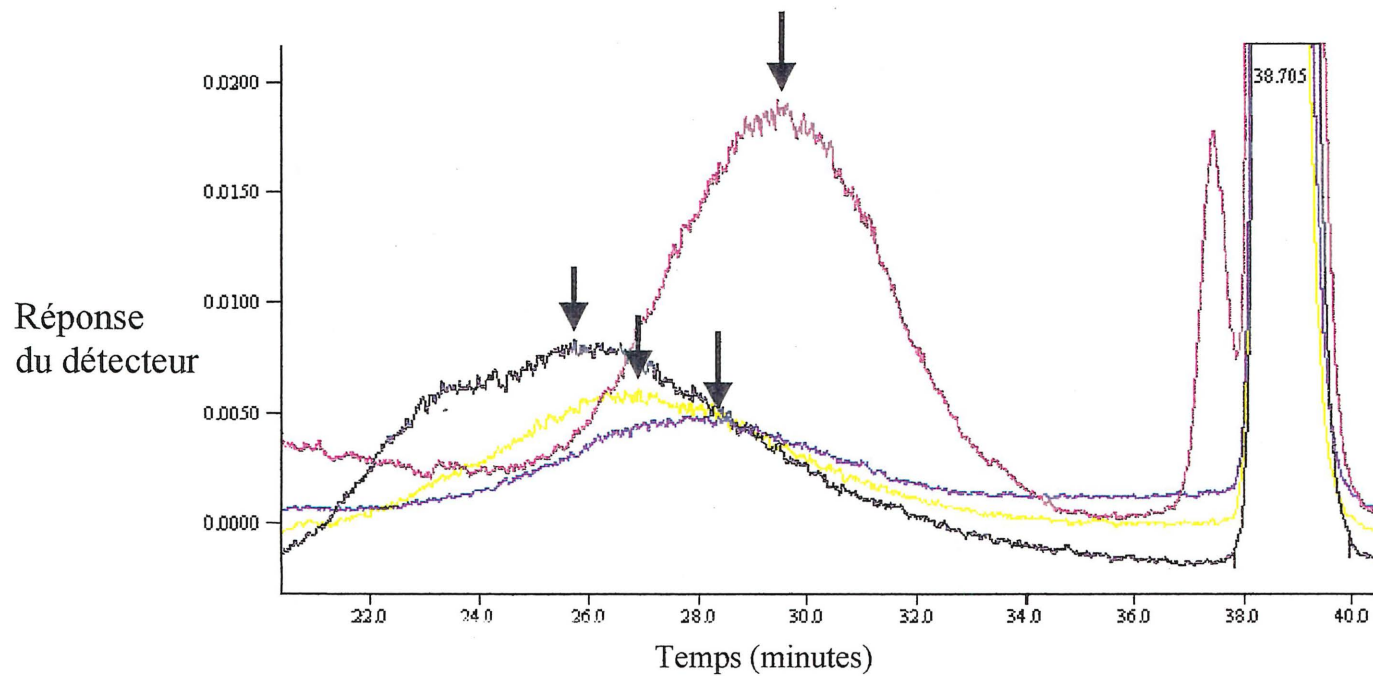


Figure 8. Variation du poids moléculaire de pustulane en fonction de la progression de l'hydrolyse.

Pustulane non-digéré

Digestion avec 50mU, 30 minutes, à 37° Celcius

Digestion avec 50mU, 60 minutes, à 37° Celcius

Digestion avec 50mU, 18 heures, à 37° Celcius

Le maximum de chaque courbe est indiqué par une flèche

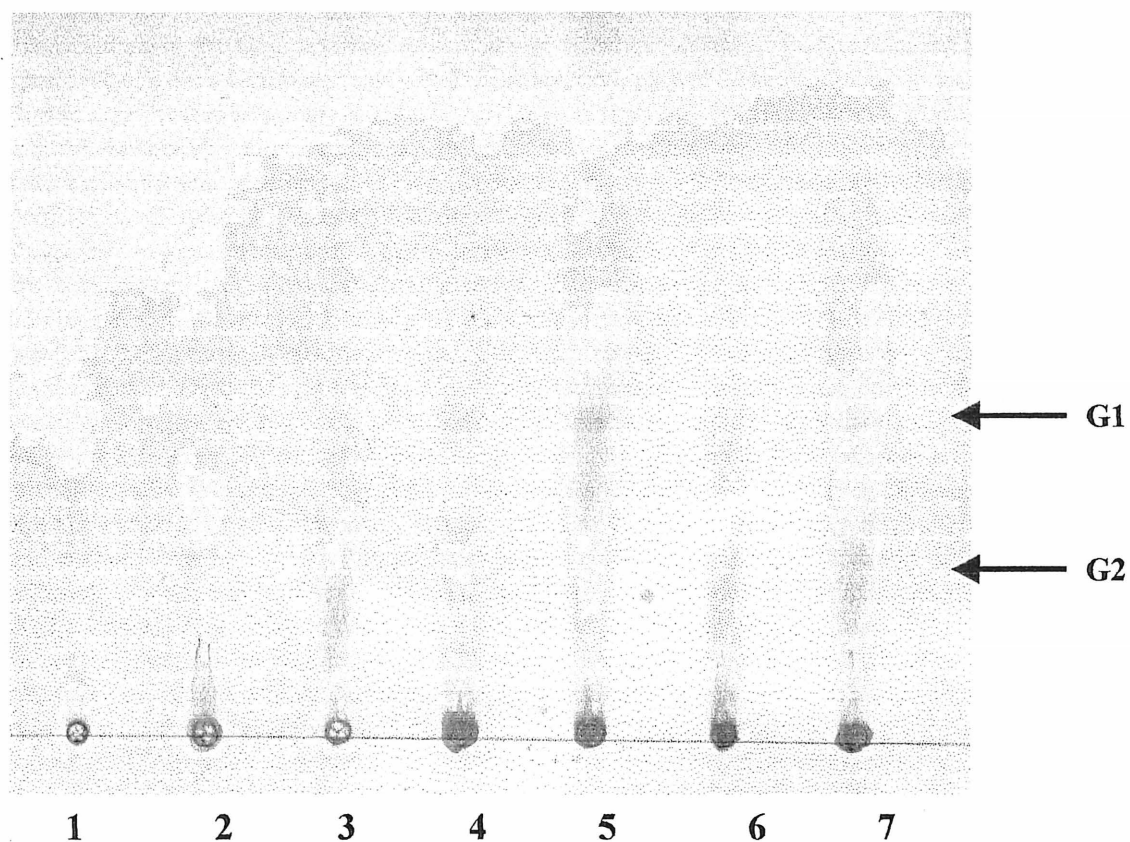


Figure 9. Chromatographie sur couche mince des produits d'hydrolyse du pustulane libérés par l'action de la β -1,6 glucanase purifiée.

G1 : gentiobiose G2 : glucose

1 : 25 mU, 10 minutes à 50⁰ Celsius

2 : 50 mU, 10 minutes à 50⁰ Celsius

3 : 50 mU, 10 minutes à 50⁰ Celsius + gentiobiose

4 : 60 mU, 20 minutes à 50⁰ Celsius

5 : 60 mU, 20 minutes à 50⁰ Celsius + glucose

6 : 60 mU, 40 minutes à 50⁰ Celsius

7 : 50 mU, 18 heures à 30⁰ Celsius

2.5 Analyse des produits de digestion du pustulane par HPLC

Une analyse par HPLC des différents hydrolysats a permis d'observer la variation du poids moléculaire du pustulane en fonction de la progression de l'hydrolyse. Les différents profils de digestions ont été superposés sur un même graphique, ainsi on peut voir que plus le temps de digestion augmente, plus le poids moléculaire du pustulane diminue (figure 8). Chaque courbe représente un temps de digestion différent et le maximum de chacune des courbes est indiqué par une flèche. Pour le pustulane non digéré, le maximum de détection fut observé à 26 minutes, pour les digestions de 30 et 60 minutes ainsi que celle de 18 heures, les maximums respectifs ont été détectés à 27, 28: 30 et 30 minutes. Une courbe standard de poids moléculaire basé sur des échantillons commerciaux de pullulane ayant une équation de $y = -0,1736x + 9,4056$, a été utilisée pour calculer le poids moléculaire du pustulane digéré pour chacune des digestions (Tableau 4)

Tableau 4. Poids moléculaire du pustulane digéré en fonction du temps de digestion.

Temps de digestion (minutes)	Poids moléculaire du pustulane digéré (kDa)
0 (non digéré)	4,892
30	4,719
60	4,458
18 heures	4,198

2.6 Analyse des séquences internes de la protéine purifiée

Suite à la digestion de l'échantillon du gel d'acrylamide coloré au bleu de Coomassie, les peptides séparés par HPLC ont été séquencés. Sur le spectre de masse, 3 pics majeurs ont été identifiés, soit un de 2058.55 Daltons à 74.767 minutes, un second de 5620.8 Daltons à 76.013 minutes et un dernier pic de 2326.6 Daltons à 78.258 min.. Nous avons obtenu une séquence unique de 12 acides aminés issue de la fraction HPLC de 74.767 minutes (tableau 5). Une recherche dans BLAST (Basic Alignment Search Tool), un algorithme de recherche de séquences homologues, nous a permis de trouver une homologie de 10 acides aminés sur une possibilité de 12, avec une protéine extracellulaire hypothétique retrouvée chez *Streptomyces coelicolor* montre l'homologie (Redenbach *et al.*, 1996). Le pourcentage d'homologie est de 95 %. Le gène codant pour la protéine hypothétique extracellulaire est cloné dans le cosmide portant le numéro 8A6.

Pour ce qui est de la séquence de la fraction HPLC de 78.258 minutes, une séquence de 10 acides aminés a été obtenue. Par contre, pour certains cycles plusieurs résidus étaient identifiés (tableau 6). Une recherche dans BLAST a donné une certaine homologie (7/12 a.a.) avec une protéine ayant un rôle dans la division cellulaire (fts 1) issue de *Streptomyces coelicolor*. Avec la fraction HPLC de 76.013 minutes, nous avons tenté d'obtenir une séquence N-terminale, mais aucune séquence n'a pu être identifiée.

Tableau 5. Séquence interne (pic de 74,767 min) de 12 acides aminés provenant de la protéine purifiée chez EF-14.

Résidu Numéro	Résidu identifié
1	Proline
2	Phénylalanine
3	Leucine
4	Tyrosine
5	Leucine
6	Aspartate
7	Glycine
8	Arginine
9	Glutamate
10	Phénylalanine
11	Arginine
12	Valine

Tableau 6. Séquence interne (pic 78,258 min) de 10 acides aminés provenant de la protéine purifiée chez EF-14.

Résidu Numéro	Résidu identifié	
	Majeur	Mineur
1	*	
2	Arginine	
3	Tyrosine	
4	Alanine, Thréonine	
5	Glutamine	Thréonine, glutamate
6	Sérine	
7	Aspartate, Thréonine	Proline
8	Glycine	Alanine, Leucine
9	Glycine	Thréonine
10	Glutamine	

* Plusieurs acides aminés possibles.

DISCUSSION

Pendant la dernière décennie, les champignons appartenant au genre *Phytophthora* ont été identifiés comme étant le principal agent pathogène s'attaquant au framboisier, et ce, aux quatre coins de la planète comme en Australie (Washington, 1988) au Chili (Latore et Munzo, 1993), en France (Nourriseau et Baudry, 1987), en Allemagne (Duncan *et al.*, 1987), en Grande-Bretagne (Montgomrie et Kennedy, 1991) aux États-Unis (Wilcox, 1989) et au Canada (Thibodeau, 1991). En 1991, 50 % des plants des framboisières de l'Estrie et de la Beauce étaient atteints. L'observation de l'appareil racinaire montrait quelques rares racines dépourvues de radicelles (Thibodeau, 1991). À l'heure actuelle, au Canada, l'Erridomil et l'alliette sont les seuls produits de lutte homologués contre *Phytophthora*. Malheureusement, il a été démontré que les traitements chimiques ont conduit à la sélection de champignons résistants à ce produit. La lutte biologique apparaît être un moyen de contrôle prometteur pour réduire l'incidence du pourridié des racines chez le framboisier. En effet, le moyen de lutte que nous proposons a pour agent un actinomycète antagoniste au *Phytophthora*.

Parmi les treize souches de *Streptomyces* antagonistes au *Phytophthora* isolées par Valois *et al.*, (1996), une a été choisie, soit la souche EF-14, pour sa capacité à lyser le mycélium du champignon pathogène. L'architecture de la paroi de ce champignon est constituée en majorité par des liens β -1,3 glucanes hautement branchés par des liens β -1,6 glucanes. Ceci nous permet de croire que l'action de la β -1,6 glucanase produite par la souche EF-14 serait essentielle, voire indispensable, à la désorganisation de la paroi, permettant la lyse complète du mycélium. Outre le rôle que pourrait jouer une β -1,6 glucanase dans le contrôle biologique, il y a un intérêt au niveau moléculaire basé sur une meilleure caractérisation de

cette enzyme. En effet, les β -1,6 glucanases sont des enzymes très peu étudiées comparativement aux β -1,3- et β -1,4 glucanases. À ce jour, aucun gène de β -1,6 glucanase n'a été décrit chez une bactérie et seul le gène provenant du champignon *Trichoderma harzianum* a été cloné et séquencé (Lora *et al*, 1996; Kofod *et al*, 1998). Une étude préliminaire effectuée dans notre laboratoire (Fayad, 1997), avait permis de connaître certaines caractéristiques de la β -1,6 glucanase de EF-14. Les objectifs principaux de ce projet étaient donc d'élaborer un protocole de purification de la β -1,6 glucanase chez EF-14, d'élucider le mode d'action sur le substrat et de déterminer la séquence de la portion N-terminale de la protéine ainsi que des séquences internes.

Afin de produire la β -1,6 glucanase de EF-14 de façon efficace, nous avons opté pour une production en fermenteur. Le milieu utilisé fut le même que celui qui avait été mis au point pour la production à plus faible échelle c'est-à-dire un milieu à base de cellules lyophilisées de *Candida utilis*, une levure disponible sur le marché. Celles-ci avaient été choisies étant donné la ressemblance dans la composition des parois cellulaires de *Phytophthora* et celle de *Candida* (Reiss *et al.*, 1992).

La production d'une grande quantité d'enzyme était nécessaire pour que la purification puisse être envisageable. En effet, grâce à l'utilisation du fermenteur, où les conditions de culture étaient optimales, nous avons réussi à obtenir une très bonne production de la β -1,6 glucanase.

Si on compare avec les souches décrites dans la littérature, nous pouvons constater que la

productivité de la β -1,6 glucanase chez la souche EF-14 était très compétitive. Effectivement, nous avons obtenu des activités pouvant aller jusqu'à 0,5 U/ml lorsqu'on cultivait EF-14 dans des conditions normales de croissance et de 2,1 U/ml lorsqu'on produisait la β -1,6 glucanase en fermenteur. Rombouts *et al.*, (1978), avaient obtenu des activités de 0,07 U/ml et de 0,09 U/ml pour les β -1,6 glucanases lytique et non lytique de *Bacillus circulans* WL-12. Ces β -1,6 glucanases avaient été produites dans un milieu à base de glucanes de levure. Un maximum de 0,31 U/ml a été produit chez *Penicillium brefeldianum*, dans un milieu contenant du pustulane (Schep *et al.*, 1984). *Gibberella fujikura* permettait d'atteindre un maximum de 0,57 U/ml de β -1,6 glucanase dans un milieu de production contenant du lutéane (Shibata et Fukimbara, 1973). Dans un milieu à base de glucanes de levure *Acinetobacter* sp. produisait 0,94 U/ml de β -1,6 glucanase (Katohda *et al.*, 1979). Chez *Flavobacterium* M64 l'activité maximale obtenue pour la β -1,6 glucosidase était de 0,93 U/ml (Sano *et al.*, 1975).

Pour obtenir un produit relativement pur, il a fallu procéder à quatre étapes de purification. Ceci nous a permis d'obtenir des séquences protéiques internes, en acides aminés. La première étape consistait en une précipitation à l'éthanol des protéines contenues dans le surnageant de culture. Cette manipulation occasionnait des pertes mais permettait aussi d'éliminer certains polysaccharides indésirables. En ce qui concerne le choix des différentes colonnes chromatographiques, plusieurs résines ont été essayées. Nous avons choisi une colonne échangeuse d'ions (cations) comme première étape de purification. La chromatographie sur échangeur d'ions est une méthode de séparation où la résine qui est chargée, dans ce cas-ci elle était chargée négativement, reçoit la préparation protéique. Les protéines établiront des interactions électrostatiques avec la résine si leur charge nette est opposée. Les protéines liées à la résine pourront être éluées en utilisant un ion possédant plus d'affinité pour la résine. La colonne utilisée (Macro-prep HS) permettait de récupérer une bonne partie de l'activité déposée sur cette résine (80 à 90 %). Nous avons choisi ce support chromatographique étant donné que celui-ci pouvait accepter des échantillons de grand

volume. La résine DEAE-Sephadex, une résine échangeuse d'anions, a elle aussi été expérimentée avec différents tampons (TRIS, bis-TRIS, diethanolamine), mais la protéine d'intérêt ne s'adsorbait pas ou semblait seulement retardée.

La seconde étape de purification consistait en une filtration sur gel, qui permet de séparer les molécules selon leur capacité à pénétrer les pores des billes qui forment la matrice chromatographique. Ainsi les molécules de petites tailles traverseront les pores et seront retardées, comparativement aux plus grosses molécules qui passeront dans le liquide entourant les billes. Nous avons utilisé le Bio-Gel A, une résine à base d'agarose qui ne montrait pas d'interaction avec la protéine à purifier. D'autres résines basées sur ce même principe ont été testées, mais celles-ci démontraient des pertes importantes de l'activité. Ces pertes résulteraient de l'affinité entre les composantes de la résine et la β -1,6 glucanase. En effet cette enzyme montrerait une affinité pour certains sucres. Une colonne d'exclusion contenant une résine de Sephacryl a été expérimentée, mais il semblait y avoir une affinité importante entre l'enzyme et un des composés de ce support, soit le dextran.

Dans le but d'atteindre la purification de la β -1,6 glucanase d'EF-14, ces deux mêmes étapes chromatographiques ont été effectuées, mais cette fois-ci par HPLC. La chromatographie à haute performance permet une meilleure résolution que le procédé chromatographique de type classique (à faible pression). Ainsi, le produit de purification récupéré démontrait une activité β -1,6 glucanase, mais suite à la visualisation de ce produit sur gel SDS-PAGE, on pouvait remarquer quelques bandes contaminantes (figure 8). Ceci découlerait du fait que nous avons utilisé seulement deux principes chromatographiques. De plus, les bandes contaminantes pourraient résulter d'une dégradation du produit purifié étant donné qu'aucun produit

stabilisateur ou inhibiteur de protéase n'a été ajouté pour préserver la stabilité de la protéine.

Lors de cette purification, nous avons eu des pertes à plusieurs niveaux, premièrement le temps d'exécution est un facteur important. Nous avons remarqué que, lorsque les étapes s'enchaînaient rapidement, de moins grandes pertes étaient enregistrées. De plus, l'ajout d'EDTA dans les tampons des premières étapes de purification semblait stabiliser les protéines. En effet, l'EDTA est utilisé pour protéger les protéines contre les métaux lourds qui peuvent les affecter ou qui seront utilisés comme cofacteur par certaines protéines. Aussi, au fur et à mesure que la purification se déroulait, on pouvait observer une inactivation de la protéine. Ceci pourrait expliquer le faible taux de récupération de 0,125 % ainsi que le degré de purification de 1,6 (tableau 1).

Nous avons donc tenté de trouver un troisième principe chromatographique. Une colonne à interactions hydrophobes a été testée. Dans ce type de chromatographie, les matrices sont chargées avec une préparation protéique à forte force ionique. Les interactions hydrophobes sont alors plus fortes. L'élution s'effectue en diminuant la force ionique pour affaiblir les interactions hydrophobes. Nous avons donc chargé la colonne avec un tampon contenant 750 mM de sulfate d'ammonium, et l'élution s'est effectuée en diminuant la concentration de sulfate d'ammonium. Lors de l'élution, nous avons obtenu un profil chromatographique montrant 3 courbes d'activité correspondantes à différentes concentrations de sulfate d'ammonium (figure 6). Ceci est probablement dû au fait que la β -1,6 glucanase d'EF-14 possède différentes régions hydrophobes exposées à sa surface. Ainsi selon la concentration de sel, la structure de la protéine sera différente et certaines régions seront plus exposées à la matrice. Un groupe de chercheurs avait eu un problème de même nature avec la β -1,6 glucanase de *Trichoderma harzianum* (Bom et al., 1998).

Un autre support chromatographique a été essayé, soit l'hydroxyapatite. Le principe de cette résine n'est pas encore bien défini, mais on sait que celle-ci est une forme cristallisée de phosphate de calcium. Ainsi, les groupements carboxyliques des protéines établissent des interactions avec la partie calcium et les groupements amines avec la partie phosphates de la matrice. En augmentant la molarité en phosphate, pour les protéines acides, ou en potassium (pour les protéines basiques), dans la solution d'élution, l'interaction sera annulée et les protéines décrocheront de la colonne (Gorbunoff et Timasheff, 1984). Plusieurs solutions pour équilibrer la colonne et appliquer la solution de protéines ont été expérimentées. Le choix le plus approprié était le NaCl 1 mM. Ainsi les protéines étaient chargées sur la colonne avec cette solution. L'hydroxyapatite semblait être un choix prometteur, mais malheureusement les protéines du mélange ne subissaient pas de séparation lors de l'élution. Ceci ne permettait donc pas d'augmenter le degré de purification.

Un autre problème auquel nous nous heurtions avec l'emploi de l'hydroxyapatite, était une perte d'activité considérable suite à une dialyse contre du NaCl 1 mM. Les fractions, issues de la colonne échangeuse d'ions (Macro-Prep HS), qui démontraient une activité β -1,6 glucanase étaient regroupées et elles devaient être dialysées contre du NaCl 1 mM pour être appliquées sur la colonne d'hydroxyapatite. Or, nous observions une perte d'activité qui était probablement due à une affinité entre l'enzyme et le sac à dialyse composé de cellulose régénérée.

Comme la β -1,6 glucanase de EF-14 semblait avoir une affinité marquée avec différents sucres, nous aurions pu exploiter cette interaction avec une matrice à base de polysaccharides ou encore de pustulane, substrat par excellence de la β -1,6 glucanase, pour en faire une chromatographie d'affinité. Cette étape aurait pu permettre d'éliminer plusieurs protéines ne

montrant pas d'interaction avec les polysaccharides ou le pustulane.

Des analyses additionnelles ont été effectuées avec cette β -1,6 glucanase pour déterminer son mode d'action sur le substrat pustulane. En examinant les différents temps de digestion, ainsi que les différentes concentrations enzymatiques utilisées nous pouvons voir que le pustulane est hydrolysé de façon à donner une série d'oligomères de tailles variées comme produits initiaux d'hydrolyse ainsi que du gentiobiose et du glucose en plus faible quantité (figure 9). Si on compare les produits générés aux temps de digestion de 10, 20 minutes et 18 heures, on peut suggérer que le pustulane de haut poids moléculaire est scindé au hasard en libérant progressivement des oligomères de tailles plus réduites. Le glucose produit ne découlerait pas des extrémités de la chaîne du pustulane mais plutôt de coupures internes du polysaccharide engendrées par un mécanisme d'attaque de type endoglucanolytique. Ainsi, sur chromatographie sur couche mince il était possible de voir, pour un même temps de digestion, des oligomères de tailles variées, du gentiobiose et du glucose. L'analyse par chromatographie à haute performance a permis de confirmer le mécanisme d'action de la β -1,6 glucanase de EF-14. En effet, nous avons pu calculer, à l'aide d'une courbe de standards d'échantillons de pullulane commerciaux, le poids moléculaire résiduel du pustulane suite aux différentes hydrolyses. Celui-ci diminuait au fur et à mesure que la réaction de digestion se prolongeait. Malheureusement, les résultats obtenus sur une colonne d'analyse d'oligosaccharides (glucose et gentiobiose) n'a pu être concluante. Le volume de l'échantillon prélevé était un peu trop faible (500 μ l) pour effectuer l'analyse complète sur les deux colonnes HPLC, soit celle des molécules de hauts poids moléculaires et celle de faibles poids moléculaires. De plus, pour l'analyse sur la colonne de hauts poids moléculaires, l'échantillon était filtré; or celui-ci avait tendance à précipiter donc une bonne proportion demeurait sur le filtre.

Les produits finaux générés par la β -1,6 glucanase purifiée chez *Streptomyces* sp. EF-14, sont du glucose et du gentiobiose contrairement à la plupart des β -1,6 glucanases décrites dans la littérature, qui ne produisent pas ou très peu de glucose, à l'exception de la β -1,6 glucanase non-lytique décrite chez *Bacillus circulans* WL-12 (Rombouts *et al.*, 1978). Des études antérieures avaient démontrés que la β -1,6 glucanase de EF-14, ne pouvait scinder les molécules de gentiobiose en glucose (Fayad, 1997). Toutes les β -1,6 glucanases purifiées à l'heure actuelle démontrent un mécanisme de type endoglucanolytique, à l'exception de la β -glucosidase décrite chez *Flavobacterium* sp., qui en plus de scinder les dimères de glucose, affiche une activité exoglucanolytique (Sano *et al.*, 1975).

En ce qui concerne le poids moléculaire de la β -1,6 glucanase de EF-14, il avait été estimé à 66 kDa (Fayad, 1992). Il est un peu plus élevé que celui de autres β -1,6 glucanases bactériennes décrites dans la littérature qui situe entre 50 et 55 kDa, tandis que celles retrouvées chez les champignons ont des poids moléculaires allant de 30 à 45 kDa.

Des séquences internes de la protéine purifiée ont été obtenues. Nous avons ensuite utilisé l'algorithme de recherche de séquences homologues BLAST, qui permet d'explorer différentes banques de données, afin de trouver des séquences homologues probables déjà existantes (Altschul *et al.*, 1990). Pour la séquence 1 de 12 acides aminés, une séquence homologue de 10 acides aminés a été trouvée dans une protéine extracellulaire hypothétique d'une longueur de 602 a.a. (SC8A6.15c), chez le microorganisme *Streptomyces coelicolor* dont le gène fait partie du cosmide 8A6. Dans le cosmide 8A6 on retrouve des gènes codant pour des protéines extracellulaires, ainsi que des protéines régulatrices (tableau 7). En examinant les protéines codées par les gènes adjacents à celui qui code pour la protéine

homologue, on retrouve un regroupement de protéines qui participent au métabolisme des hydrates de carbone, comme des protéines extracellulaires et régulatrices, des protéines liant les sucres, deux β -glucosidases, ainsi que des protéines dédiées au transport des hydrates de carbone. Une carte montrant le gène de la protéine SC8A6.15c ainsi que ceux voisins de celle-ci a été dressée (figure 10).

La seconde séquence obtenue d'une longueur de 7 acides aminés contenait plusieurs incertitudes pour certains résidus, ainsi il y avait une possibilité des deux acides aminés pour la même position soit, un résidu majeur et un second résidu mineur. Cette séquence de 7 a.a. montrait une homologie avec 5 acides aminés d'une protéine intracellulaire, mais cette homologie semblait moins intéressante étant donné, premièrement que la protéine démontrant une homologie est intracellulaire, et de plus, comme la séquence est plus courte, elle est donc moins fiable.

Tableau7. Gènes retrouvés dans le cosmide 8A6 de *Streptomyces coelicolor*

Symbole et fonction du gène	Coordonnées du gène (a.a)	Longueur (a.a.)
SC8A6.01 Protéine hypothétique	1-649	>215
SC8A6.02c Protéine hypothétique de transport transmembranaire	710-650	476
SC8A6.03c Protéine hypothétique contenant une signature pour le transport des sucres	4376-2232	714
SC8A6.04c Transférase*	5613-4381	410
SC8A6.05c Enzyme requérant du TPP	7307-5622	560
SC8A6.06 Succinyl-CoA synthétase à chaîne Béta	7451-8602	383
SC8A6.07 Succinyl-CoA synthétase à chaîne Alpha	8617-9543	308
SC8A6.08 Déshydrogénase*	9025-9462	520
SC8A6.09c Protéine hypothétique	12561-11230	443

SC8A6.10 Facteur G d'élongation	13173-15233	686
SC8A6.11c Estérase extracellulaire*	17678-15471	735
SC8A6.12 Protéine extracellulaire hypothétique	17712-18218	168
SC8A6.13c Protéine extracellulaire hypothétique	18729-18340	129
SC8A6.14c Lipoprotéine servant à l'attachement des lipides à la membrane chez les prokaryotes	22169-18726	1147
SC8A6.15c Protéine extracellulaire hypothétique homologue à la séquence de 12 a.a de la β -1,6 glucanase d'EF-14	24326-22518	602
SC8A6.16c Protéine extracellulaire hypothétique	25675-24593	380
SC8A6.17 Protéine extracellulaire hypothétique	25770-27539	589
SC8A6.18 β -glucosidase*	27571-30150	859
SC8A6.19 Régulateur de transcription	30247-31287	246
SC8A6.20c Régulateur de transcription	31956-31303	217

SC8A6.21c Régulateur de transcription	33447-32122	441
SC8A6.22 Protéine extracellulaire liant les sucres	33623-34939	438
SC8A6.23 Protéine pour le transport transmembranaire des sucres	35001-36029	342
SC8A6.24 Protéine pour le transport transmembranaire des sucres	36037-36876	279
SC8A6.25 β-glucosidase*	36873...>37445	>190

***Protéines identifiées avec une forte probabilité**

c, indique que la séquence du gène insérée dans le cosmide est lue de façon inverse c'est-à-dire de la droite vers la gauche.

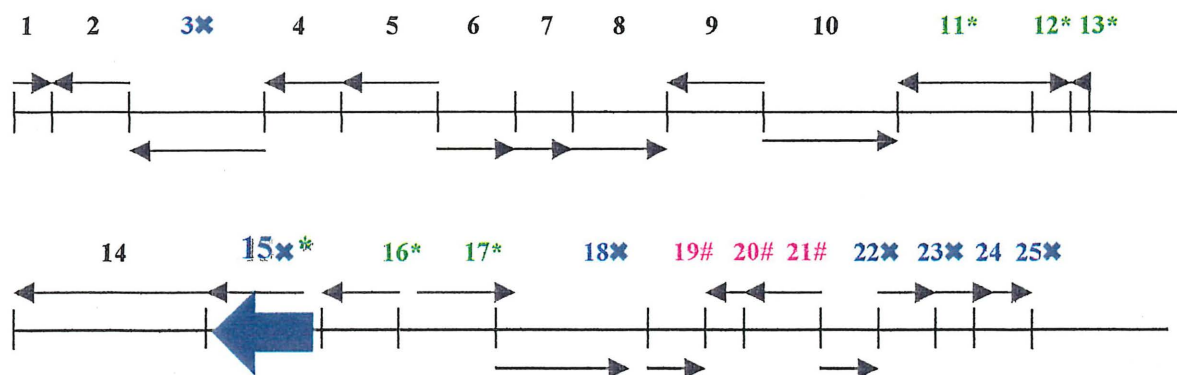


Figure 10. Carte du cosmide SC8A6.

1 : SC8A6.01	12 : SC8A6.12	23 : SC8A6.23
2 : SC8A6.02c	13 : SC8A6.13c	24 : SC8A6.24
3 : SC8A6.03c	14 : SC8A6.14c	25 : SC8A6.25
4 : SC8A6.04c	15 : SC8A6.15c (Protéine homologue)	
5 : SC8A6.05c	16 : SC8A6.16c	
6 : SC8A6.06	17 : SC8A6.17	
7 : SC8A6.07	18 : SC8A6.18	
8 : SC8A6.08	19 : SC8A6.19	
9 : SC8A6.09c	20 : SC8A6.20c	
10 : SC8A6.10	21 : SC8A6.21c	
11 : SC8A6.11c	22 : SC8A6.22	

* : Protéines extracellulaires

x : Protéines dont la fonction est liée au métabolisme des sucres

: Régulateur de transcription

À l'aide du serveur Signal P, (<http://www.cbs.dtu.dk/services/signalP/index.html>) (Nielsen *et al.*, 1997), il a été possible d'estimer que cette protéine aurait un peptide signal de 46 a.a. Le poids moléculaire de la protéine homologue serait d'environ 61 kDa, ce qui est relativement près du poids moléculaire de la β -1,6 glucanase de *Streptomyces* sp. EF-14, qui est de 66 kDa.

Cette séquence de 12 acides aminés semble, d'après les informations recueillies, provenir de la β -1,6 glucanase, où du moins d'une protéine extracellulaire ayant un rapport étroit avec les sucres, et non d'une protéine contaminante. L'objectif était d'obtenir deux séquences internes fiables afin d'élaborer des amorces d'acides aminés pour le PCR (polymerase chain reaction). Ces amorces pourraient permettre de situer le gène codant pour la β -1,6 glucanase dans le génome de *Streptomyces* sp. EF-14. Ainsi, suite à une localisation, il nous serait possible de connaître la séquence complète de ce gène. Une fois la séquence de ce gène connue, un fragment du gène codant pour la β -1,6 glucanase pourrait être cloné dans un vecteur approprié pour effectuer une expérience d'interruption génique. Cette technique consiste en une ou plusieurs recombinaisons homologues entre le fragment du gène d'intérêt et le génome sauvage de EF-14. Ainsi, le gène incomplet sera intégré par la souche sauvage. Par la suite, l'ampleur de ces interruptions sera vérifiée au niveau enzymatique et au niveau de l'antagonisme entre les souches mutantes et le champignon *Phytophthora fragariae* var *rubi*. Le rôle de la β -1,6 glucanase pourrait de cette façon, être élucidé.

De plus, vu la disponibilité du microorganisme *Streptomyces coelicolor* dans notre laboratoire, il serait possible d'envisager d'isoler le gène codant pour cette protéine hypothétique du génome de *Streptomyces coelicolor* et de vérifier sa fonction. Ceci s'effectuerait aisément à l'aide du PCR, étant donné que la séquence complète de ce gène est connue. Cette étude aurait donc un double rôle, soit de localiser chez EF-14 le gène codant

pour la β -1,6 glucanase, et de déterminer la fonction de cette protéine, hypothétique jusqu'à maintenant, chez *Streptomyces coelicolor*.

Malheureusement, la séquence N-terminale de la protéine purifiée n'a pu être déterminée, étant donné la quantité trop faible de l'échantillon purifié. Il serait donc souhaitable de purifier cette protéine selon le protocole de purification qui a été établi lors de cette recherche. Ainsi une information importante serait obtenue soit la séquence N-terminale de la protéine d'intérêt. De plus, cette séquence pourrait être comparée avec la séquence N-terminale déterminée par Fayad (1997). Cependant, nous n'avons retrouvé aucune séquence N-terminale homologue à celle de Fayad dans le cosmide 8A6 de *Streptomyces coelicolor*. Il est rapporté dans la littérature que les protéines extracellulaires possèdent des domaines N-terminaux qui peuvent différer, c'est le cas chez les chitosanases (Fukamizo et Brzezinski, 1997). D'ailleurs, il existe un site internet montrant la variabilité au niveau N-terminal des différentes chitosanases (<http://www.callisto.si.usherb.ca/~rbrzezini/general1.htm>).

CONCLUSION

La souche EF-14 avait été retenue comme étant un antagoniste au champignon phytopathogène *Phytophthora fragariae* var *rubi*. pour sa production d'enzymes hydrolytiques, notamment des β -glucanases.

L'optimisation des conditions de culture de la souche en fermenteur, nous a permis de purifier la β -1,6 glucanase et ainsi obtenir de nouvelles informations sur le mode d'action de cette enzyme. La β -1,6 glucanase affiche un mode d'hydrolyse du substrat endo glucanolytique. De plus, des séquences internes en acides aminés de la protéine purifiée ont été obtenues. L'algorithme de recherche de séquences homologues BLAST a été consulté afin de trouver des séquences homologues déjà existantes. En effet, une forte homologie a été trouvée pour l'une des deux séquences internes d'acides aminés. Cette séquence homologue provient d'une protéine extracellulaire hypothétique retrouvée chez *Streptomyces coelicolor*. Une recherche plus approfondie nous a permis de découvrir que cette protéine hypothétique aurait un lien étroit avec d'autres protéines extracellulaires qui participent au mécanisme de régulation, liaison et transport des carbohydrates.

L'obtention d'une seconde séquence en acides aminés interne fiable permettrait l'élaboration d'amorces pour le PCR. Celles-ci serviraient à la localisation du gène codant pour la β -1,6 glucanase de *Streptomyces* sp. EF-14.

L'isolement du gène de la protéine extracellulaire hypothétique chez *Streptomyces coelicolor* serait à envisager. Ainsi, la fonction de cette protéine serait déterminée.

On retrouve peu d'informations sur les propriétés moléculaires des β -1,6 glucanases microbiennes. À l'heure actuelle, seul le gène de la β -1,6 glucanase de *Trichoderma harzianum* a été cloné et sa séquence déterminée. L'étude entreprise sur la purification de la β -1,6 glucanase de *Streptomyces* EF-14, permettra éventuellement de déterminer sa structure et ses caractéristiques du point de vue moléculaire. Ensuite, il sera possible de déterminer le rôle de cette enzyme dans le phénomène d'antagonisme envers *Phytophthora*.

BIBLIOGRAPHIE

ALEXOPOULOS, C.J. et C.W. MIMS. 1979. *Introductory Mycology*, 3rd ed. New-York, John Willey & Sons, 632 pp.

ALTSCHUL, S. F., W. GISH, W. MILLER, E. W. MYERS et D. J. LIPMAN. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.

ARTIGUES, M. & P. DAVET. 1984. Activités (1-3) glucanique et chitinique de quelques champignons, en relation avec leur aptitude à détruire les sclerotes de *Corticium rolsii* dans la terre stérile. *Soil Biol. and Biochem.* 16 : 527-538.

BACON, J. S. D., V. C. FARMER, D. JONES et I. F. TAYLOR. 1969. The glucan components of the cell wall of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) considered in relation to its ultrastructure. *Biochem. J.* 114: 557-567.

BARTNICKI-GARCIA, S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 22: 87-109.

BARTNICKI-GARCIA, S. et M. C. WANG. 1983. Biochemical aspects of morphogenesis in *Phytophthora*, p. 121-137. In D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia and P. H. Tsao (ed.). *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*. APS Press, St Paul, Minn.

BIBB, M. J., P. R. FINDLAY et M. W. JOHNSON. 1984. The relationship between base

composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequence. *Gene*. 30: 157-166.

BIELECKI, S. et E. GALAS. 1991. Microbial β -glucanases different from cellulases. *Crit. Rev. Biotechnol.* 10: 275-304.

BISHOP, C. T., F. BLANK et P. E. GARDNER. 1960. The cell wall polysaccharides of *Candida albicans*: glucan, mannan and chitin. *Can. J. Chem.* 38: 869-881.

BOM, I. J., S. K., DIELBANDHOESING, K. N. HARVEY, S. J. C. M. OOMES, F. M. KLIS et S. BRUL. 1998. A new tool for studying the molecular architecture of fungal cell wall : one-step purification of recombinant *Trichoderma* β -(1-6)-glucanase expressed in *Pichia pastoris*. *Biochim. et Biophys. Acta* 1425 : 419-424.

BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.

BROADBENT, P., K. F. BAKER et Y. WATERWORTH. 1971. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. *Aust. J. Biol. Sci.* 24: 925-944.

CHATTOPADHYAY, S. K. et B. NANDI. 1982. Inhibition of *Helminthosporium oryzae* and *Alternaria solani* by *Streptomyces longisporus* (Krasil'nikov) Waksman. *Plant Soil*. 69: 171-175.

CRAWFORD, D. L., J. M. LYNCH, J. M. WHIPPS et M. A. OUSLEY. 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3899-3905.

DE LA CRUZ, J. J., A. PINTOR-TORO, T. BENITEZ et A. LLOBELL. 1995. Purification and characterization of an endo- β -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. *J. Bacteriol.* 177 : 1864-1871.

DUNCAN, J.M., D. M., KENNEDY et E. SEEMÜLLER. 1987. Identities and pathogenicity of *Phytophthora* spp. causing root of red raspberry. *Plant Pathol.* 36 : 276-289.

ELAD, Y., I. CHET et Y. HENIS. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* 27: 719-725.

FAUCHER, E., T. SAVARD et C. BEAULIEU. 1992. Characterization of actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Can. J. Plant Pathol.* 14: 197-202.

FAYAD, K. 1997. La β -1,6-glucanase de *Streptomyces* sp. EF-14, un actinomycète antagoniste à *Phytophthora* spp.: production, purification et caractérisation. Mémoire de Maîtrise. Département de Biologie. Faculté des Sciences. Université de Sherbrooke.

FERNANDO W. D. G., R. G. LINDERMAN. 1994. Chemical control of stem and root rot of cowpea caused by *Phytophthora vignae*. *Plant Disease.* 78(10) : 967-971.

FLEET, G. H. et H. J. PHAFF. 1974. Lysis of yeast cell walls: glucanases from *Bacillus circulans* WL-12. *J. Bacteriol.* 119: 207-219.

FLETT, S. P., W. J. ASHCROFT, P. H. JERIE et P. A. TAYLOR. 1991. Control of *Phytophthora* root rot in processing tomatoes by metalaxyl and fosetyl-Al. *Aust. J. Exp. Agric.* 31(2) : 279-283.

FUKAMIZO T. et BRZEZINSKI R. 1997. Chitosanase from *Streptomyces* sp. Strain N174 : a comparative review of its structure and fonction. *Biochem. Cell Biol.* 75 : 687-696.

GILBERT, M., R. MOROSOLI, F. SCHARECK et D. KLUEPFEL. 1995. Production and secretion of protein by *Streptomyces*. *Crit. Rev. Biotechnol.* 15: 13-39.

GORBUNOFF M. J. et S. N. TIMASHEFF. 1984. The interaction of proteins with hydroxyapatite. *Anal. Biochem.* 136 : 440-445.

HIURA, N., T. NAKAJIMA et K. MATSUDA. 1987. Purification and some properties of an endo- β -1,6-glucanase from *Neurospora crassa*. *Agric. Biol. Chem.* 51: 3315-3321.

HOPWOOD, D. A., M. J. BIBB, K. F. CHATER, T. KIESER, C. J. BRUTON, H. M. KIESER, D. J. LYDIATE, C. P. SMITH, J. M. WARD ET H. SCHREMPF. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*, a laboratory manual. The John Innes Foundation. Norwich. 338 p.

HUSSAIN, S., A. GHAFAR, et M. ASLAM. 1990. Biological control of *Macrophomina phaseolina* charcoal rot of sunflower and mung bean. *J. Phytopathol.* 130:157-160.

KATOHDA, S., F. SUZUKI, S. KATSUKI et T. SATO. 1979. Purification and some properties of endo- β -1,6-glucanase from *Acinetobacter* sp. Agric. Biol. Chem. 43: 2029-2034.

KAPTEYN, J. C., R. C. MONTIJN, E. VINK, J. DE LA CRUZ, A. LLOBELL, J. E. DOUWES, H. SHIMOI, P. N. LIPKE et F. M. KLIS. 1996. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked β -1,3- β -1,6-glucan heteropolymer. Glycobiology 6: 337-345

KNAUSS, J. S. 1976. *In vitro* antagonistic activity of several *Streptomyces* spp. against species of *Pythium* and *Phytophthora*. Plant Dis. Rep. 60: 846-850.

KOFOD, L. V., L. N. ANDERSEN, M. S. KAUPPINEN, N. S. CHRISTGAU, H. DALBOGE et H. S. OLSEN. 1998. Enzyme with β -1,6-endoglucanase activity. United States Patent. Patent Number 5770406.

LAHDENPERÄ, M. L., E. SIMON et J. UOTI. 1991. Mycostop – a novel biofungicide based on *Streptomyces* bacteria, p. 258-263. In A. B. R. Beemster, G. J. Bollen, M. Gerlach, M. A. Ruissen, B. Schippers and R. A. Tempel (ed.). Biotic interactions and soil-borne diseases; Proceedings of the 1st Conference of the European Foundation for Plant Pathology. Elsevier, Amsterdam.

LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 :680-685.

LATORE, B. A., et R. MUNZO. 1983. Root rot of red raspberry caused by *Phytophthora citricola* and *Phytophthora citrophthora* in Chile. Plant Dis. 77 :715-718.

LEVER, M. 1973. Colorimetric and fluorimetric carbohydrate determination with p-hydroxybenzoic acid hydrazide. *Biochem. Med.* 7:274-281.

LINDBERG, B. et J. MCPHERSON. 1954. Studies on the chemistry of lichens. VI. The structure of pustulan. *Acta Chem. Scand.* 8: 985-988.

LORA, J. M., J. DE LA CRUZ, A. LLOBELL, T. BENITEZ et J. A. PINTER-TORO. 1995. Molecular characterization and heterologous expression of an endo- β -1,6-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Mol. Gen. Genet.* 247: 639-645.

MANNERS, D. J., A. J. MASSON et J. C. PATTERSON. 1973. The structure of a β -1,3-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem. J.* 135: 31-36.

MERRIMAN, P. R., R. D. PRICE et K. F. PRICE. 1974. The effect of inoculation of seed with antagonists of *Rhizoctonia solani* on the growth of the wheat. *Aust. J. Agric. Res.* 25: 213-218

MIYAZAKI, T. et N. OIKAWA. 1976. An endo-(1,6)- β -D-glucanase from *Mucor hiemalis*. *Carbohydr. Res.* 48: 209-216.

MONTGOMRIE, I. G. et D. M. KENNEDY. 1980. The pathogenicity of *Phytophthora* species to red raspberry. *Acta Hortic.* 112 : 167-176.

MOURICHON, X. P. SOULEZ et B. RUIZ. 1984. Efficacité comparée du metalaxyl (Ridomil) et du phosethyl aluminium (Aliette) sur la maladie racinaire de l'avocatier causée

par *Phytophthora cinamoni* en Cote d'Ivoire. Recherche d'un contrôle de la maladie en pépinière. Fruits 39(1) : 51-59.

NICKERSON, N. L. 1990. Metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora fragariae* in Nova Scotia. Strawberry newsletter no. 4. Departement of Agriculture and Marketing Nova Scotia, Canada.

NIELSEN, H., J. ENGELBRECHT, S. BRUNAK et G. VON HEIJNE. 1997. A neutral network method for identification of prokaryotic and eucaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Int. J. Neural Sys. 8 : 581-599.

NORONHA, E. F. et C. J. ULHOA. 1996. Purification and characterization of an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. Can. J. Microbiol. 42: 1039-1044.

NOURRISEAU, G. et A. BEAUDRY. 1987. Un *Phytophthora* cause de dépérissement du framboisier en France. Phytoma 394 :26-32.

PITSON, S. M., R. J. SEVIOUR et B. M. MCDUGALL. 1993. Noncellulolytic fungal β -glucanases: their physiology and regulation. Enzyme and Microb. Technol. 15: 178-192.

PITSON, S. M., R. J. SEVIOUR, B. M. MCDUGALL, B. A. STONE et M. SADEK. 1996. Purification and characterization of an extracellular (1,6)- β -glucanase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum*. Biochem. J. 316: 841-846.

PRIDHAM, T. G., P. ANDERSON, C. FOLEY, L. A. LINDENFELSER, C. W. HESSETINE et R. G. BENEDICT. 1956-1957. A selection of media for maintenance and taxonomic study of Streptomyces. Antibiotics Ann. 1956-1957 :947-953.

REDENBACH, M., H. M. KIESER, D. DENAPAITE, A. EICHNER, J. CULLUM, H. KINASHI et D. A. HOPWOOD. 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. Mol. Microbiol. 21 (1): 77-96.

REESE, E. T., F. W. PARRISH et M. MANDELS. 1962. β -D-1,6-glucanases in fungi. Can. J. Microbiol. 8: 327-334.

REISS, E., V. M. HEARN, D. POULAIN et M. G. SHEPHERD. 1992. Structure and function of the fungal cell wall. J. Med. Vet. Mycol. 30 : 143-156.

ROMBOUTS, F. M. et H. J. PHAFF. 1976. Lysis of yeast cell walls. Lytic β -(1,6)-glucanase from *Bacillus circulans* WL-12. Eur. J. Biochem. 63: 109-120.

ROMBOUTS, F. M., G. H. FLEET, D. J. MANNERS et H. J. PHAFF. 1978. Lysis of yeast cell-walls: non-lytic and lytic (1,6)- β -D-glucanases from *Bacillus circulans* WL-12. Carbohyd. Res. 64: 237-249.

ROTHROCK, C. S. et D. GOTTLIEB. 1984. Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. Can. J. Microbiol. 30: 1440-1447.

SABAOU, N. et N. BOUNAGA. 1987. Actinomycètes parasites de champignons: études des espèces, spécificité de l'action parasitaire au genre *Fusarium* et antagonisme dans le sol envers le *Fusarium oxysporium* F. sp. *albedinis* (Killian et Marie) Gordon. Can. J. Microbiol. 33: 445-451.

SANO, K., A. AMEMURA et T. HARADA. 1975. Purification and properties of a β -1,6-glucosidase from *Flavobacterium*. Biochim. Biophys. Acta. 377: 410-420.

SANTOS, T., J. R. VILLANUEVA et C. NOMBELA. 1977. Production and catabolite repression of *Penicillium italicum* β -glucanases. J. Bacteriol. 129: 52-58.

SCHEP, G. P., M. G. SCHEPHERD et P. A. SULLIVAN. 1984. Purification and properties of a β -1,6-glucanase from *Penicillium brefeldianum*. Biochem. J. 223: 707-714.

SHIBATA, Y. et T. FUKIMBARA. 1973. Enzymic hydrolysis of glucans containing β -1,3 and β -1,6-linkages: β -1,6-glucan hydrolase of fungi. J. Ferment. Technol. 51: 216-226.

STAHL, E. et U. KALTENBACH. 1961. Dünnschicht-chromatographie. J. Chromatogr. 5: 351-355.

THIBODEAU, P. O. 1991. Le pourridié (*Phytophthora*) du framboisier s'est installé au Québec. Pages 15-24 in Colloque sur le framboisier «Point sur la production», Conseil des producteurs végétales du Québec, Ministère de l'agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Québec.

TOUSSAINT, V., D. VALOIS, M. DODIER, E. FAUCHER, C. DERY, R. BRZEZINSKI, L. RUEST et C. BEAULIEU. 1997. Characterization of actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. *Phytoprotection*. 78 (2): 43-51.

UTKHEDE, R. S. et E. M. SMITH. 1991. *Phytophthora* and *Pythium* species associated with root rot of young apple trees and their control. *Soil Biol. Biochem.* 23(11) : 1059-1063.

VALOIS, D., K. FAYAD, T. BARASUBIYE, M. GARON, C. DERY, R. BRZEZINSKI et C. BEAULIEU. 1996. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1630-1635.

WADI, J. A. et G. G. EASTON. 1985 Control of *Verticillium dahliae* by coating seed pieces with antagonistic bacteria, p. 134-136. dans *Ecology and management of soilborne pathogens*. Editeurs: C. A. Parker, A. D. Rovira, K. J. Moore, P. T. Wong et J. F. Kollmoger. Amer. Phytopathol. Soc., St-Paul, Minn.

WASHINGTON, W. S. 1988. *Phytophthora cryptogea* as a cause of root rot of raspberry in Australia ; resistance of raspberry cultivars and control by fungicides. *Plant Pathol.* 37 :225-230.

WILCOX W. F. 1989. Identify, virulence and isolation frequency of seven *Phytophthora* spp. causing root rot of raspberry in New York. *Phytopathology*. 79 :93-101.

YALPANI, M. 1988. Polysaccharides, synthesis, modification and structure/property relations. Elsevier, Amsterdam.

YAMAMOTO, S., R. KOBAYASHI et S. NAGASAKI. 1974. Purification and properties of an endo β -1,6-glucanase from *Rhizopus chinensis* R-69. Agric. Biol. Chem. 38: 1493-1500.